

Charakterisierung des Multi-Zinkfinger Transkriptionsfaktors Trps1 während der Chondrozyten Differenzierung

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Markus Pasdziernik

aus Swinemünde

im September 2012

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Zentrum für Medizinische Biotechnologie in der Abteilung für Entwicklungsbiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Vortkamp
2. Gutachter: Prof. Dr. M. Ehrmann
3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. B. Horsthemke

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2012

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	VI
Ein- bzw. Drei-Buchstaben-Code der proteinogenen Aminosäuren:	VIII
II. Abbildungsverzeichnis	IX
III. Tabellenverzeichnis	XI
1. Einleitung	1
1.1. Das Vertebratenskelett	1
1.1.1. Desmale Knochenentwicklung	2
1.1.2. Enchondrale Knochenentwicklung	2
1.2. Der Transkriptionsfaktor Trps1	5
1.3. Histondeacetylasen in Differenzierungsprozessen	6
1.4. Mitoseregulation durch Histondeacetylasen	11
1.5. Hitzeschock Proteine und Chromatin bzw. Histondeacetylasen	12
2. Zielsetzung	14
3. Material und Methoden	16
3.1. Arbeitsvorbereitungen	16
3.2. Material	16
3.2.1. Chemikalien	16
3.2.2. Enzyme	17
3.2.3. Antikörper	17
3.2.4. Verbrauchsmaterialien und Sonstiges	18
3.2.5. Kits	18
3.2.6. Geräte und Software	18
3.2.7. Lösungen und Puffer	20
3.2.8. Nährmedien für Bakterien	22
3.2.9. Zellkultur Medien	23
3.2.10. Bakterienstämme	24
3.2.11. Zelllinien	24
3.2.12. Mausstämmen	24
3.2.13. siRNA Oligonukleotide	24
3.2.14. Expressionsplasmide	25
3.3. Methoden	26
3.3.1. Mikrobiologische Methoden	26
3.3.1.1. Nährmedien	26
3.3.1.2. Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen	26
3.3.2. Molekularbiologische Methoden	26
3.3.2.1. Konzentrationsbestimmung von DNA	26
3.3.2.2. Lagerung von DNA	27
3.3.2.3. Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	27
3.3.2.4. Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	27

3.3.2.5.	Plasmid-Präparation.....	28
3.3.2.6.	Transformation von Bakterien mit Plasmiden	28
3.3.2.6.1.	Transformation chemisch kompetenter Bakterien	28
3.3.2.7.	Transformation elektrokompeter Bakterien	28
3.3.3.	Histologie.....	29
3.3.3.1.	Einbettung der Vordergliedmaßen der Maus in Paraffin	29
3.3.3.2.	Anfertigung von Schnitten der Gliedmaßen	30
3.3.3.3.	Immunhistochemische Antikörperfärbung.....	30
3.3.4.	Zellkultur.....	31
3.3.4.1.	Einfrieren von Zelllinien	31
3.3.4.2.	Auftauen von Zelllinien	31
3.3.4.3.	Kultivierung von Zelllinien.....	31
3.3.4.4.	DNA Transfer in Zelllinien	32
3.3.4.4.1.	DNA Transfer in ATDC5 Zellen	32
3.3.4.4.2.	DNA Transfer in HEK293 EBNA Zellen	33
3.3.4.5.	Zellyse.....	33
3.3.4.6.	Zellfraktionierung.....	33
3.3.4.7.	ATDC5 Differenzierung.....	34
3.3.4.8.	Alzian Blau Färbung der ATDC5 Nodules	34
3.3.5.	Proteinbiochemische Methoden.....	34
3.3.5.1.	Co-Immunpräzipitation	34
3.3.5.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	35
3.3.5.3.	Westernblot	35
3.3.5.4.	Hdac Aktivitätstest	36
3.3.5.5.	Gelfiltration	36
3.3.5.6.	Statistik und Auswertungen.....	37
4.	Ergebnisse.....	38
4.1.	Trps1 und Hdac Proteine sind während der Knorpel- und Knochenentwicklung parallel exprimiert.....	38
4.1.1.	Trps1 wird in distalen, proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten exprimiert.....	38
4.1.2.	Trps1 wird kontinuierlich, aber leicht erhöht während der ATDC5 Differenzierung exprimiert.....	40
4.1.3.	Hdac4 wird in proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten und in Osteoblasten exprimiert	41

4.1.4. Hdac4 wird in ATDC5 Zellen kontinuierlich während der Differenzierung exprimiert	43
4.1.5. Hdac6 wird in allen Chondrozyten exprimiert	44
4.1.6. Die Hdac6 Expression beginnt nach sieben Tagen Differenzierung.....	46
4.2. Trps1 interagiert mit Hdac Proteinen	47
4.2.1. Trps1 interagiert mit Hdac4	47
4.2.2. Trps1 interagiert mit Hdac6	50
4.3. Trps1 modifiziert die Hdac Proteinfunktion.....	51
4.3.1. Trps1 reduziert die H3K9 und H3K18 Acetylierung.....	51
4.3.2. Trps1 Verlust erhöht die H3K9 und H3K18 Acetylierung	52
4.4. Trps1 erhöht die Hdac Proteinaktivität.....	54
4.4.1. Trps1 steigert die Hdac Proteinaktivität in Zellkulturen	54
4.4.2. Trps1 Verlust führt zu reduzierter Hdac Proteinaktivität <i>in vivo</i>	56
4.5. Die Interaktion von Trps1 mit Hdac1 und Hdac4 ist verantwortlich für die erhöhte Hdac Proteinaktivität.....	57
4.6. Hdacs und HATs beeinflussen die ATDC5 Differenzierung	61
4.7. Die Histone H3 Acetylierung ändert sich während der ATDC5 Differenzierung.....	65
4.8. Trps1 interagiert in unterschiedlichen Proteinkomplexen	67
4.9. Trps1 interagiert mit weiteren Transkriptionsfaktoren und Hitzeschock Proteinen (Hsp)	70
4.9.1. Co-IP mit überexprimiertem Trps1	71
4.9.2. Co-IP mit endogenem Trps1.....	72
4.10. Trps1 interagiert mit Hsp90	74
5. Diskussion.....	75
5.1. Trps1 interagiert mit Histondeacetylasen.....	75
5.2. Trps1 erhöht die Hdac Aktivität	76
5.3. Die reduzierte Hdac Aktivität in Trps1 ^{-/-} Mäusen resultiert in Mitosedefekten	77
5.4. Hdacs regulieren die ATDC5 Differenzierung.....	80
5.5. Trps1 kommt in Proteinkomplexen vor	82
5.6. Trps1 interagiert mit Transkriptionsfaktoren, Chromatinmodifikatoren und Hitzeschock Proteinen.....	83
5.7. Trps1 interagiert mit Hsp90	84
6. Zusammenfassung.....	86
7. Abstract	88
8. Literaturverzeichnis.....	89
9. Anhang.....	100
9.1. Tabellen	100
9.2. Plasmidkarte pEGFP-N3.....	103
Danksagung	104
Publikationen, Poster und Vorträge.....	105
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Erklärungen	108

I. Abkürzungsverzeichnis

°C	Temperatur in Grad Celsius
A	Adenin
ac	Acetyliert
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgen Rezeptor
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaar
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	Circa
cDNA	komplementäre DNA
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
C-Terminus	Carboxyterminus
Cy	Zytoplasma Fraktion
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d.h.	das heißt
diff	differenziert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>Desoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
E	embryonaler Tag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
et al.	Und weitere
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
FACS	engl. <i>Fluorescence activated cell sorting</i> ; Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i> ; fötales Kälber Serum
G	Guanin
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GZ	Ganz-Zell Fraktion
h	Stunde
H3	Histon H3

H3K9ac	acetyliertes Lysin 9 des Histon H3
H3K18ac	acetyliertes Lysin 18 des Histon H3
HAT	Histon Acetyl Transferase
Hdac	Histondeacetylase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HSP	engl. <i>Heat Shock Protein</i> ; Hitzeschockprotein
IN	Input
IP	Immunpräzipitation
ITS	Insulin Transferrin Selenium
Kb	Kilobasenpaar
kDA	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
M	Molar
M	Marker
mA	Milliampère
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA
NaOH	Natriumhydroxid
nM	Nanomolar
N-Terminus	Aminoterminal
Nu	nukleäre Fraktion
neg	Negativ-Kontrolle
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMF	Peptide-Mass-Fingerprint
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
u.t.	untransfiziert
SDS	Natriumlaurylsulfat
sek	Sekunde
SOC	Super optimales Medium
ss	Einzelstrang
STABW	Standardabweichung
T	Thymin
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin

Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TSA	Trichostatin A
Trps	Tricho-Rhino-Phalangeales Syndrom
U	Enzymaktivitätseinheit
ÜN	Über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
ÜS	Überstand
usw.	und so weiter
V	Volt
v/v	engl. <i>volume per volume</i> ; Volumen pro Volumen
w/v	engl. <i>weight per volume</i> ; Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
zf	Zinkfinger

Ein- bzw. Drei-Buchstaben-Code der proteinogenen Aminosäuren:

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Zystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glyzin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleuzin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leuzin	Y	Tyr	Tyrosin

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Vorderextremität der Maus	1
Abbildung 1-2: Darstellung der enchondrale Ossifikation	4
Abbildung 1-3: Modell der Trps1 Domänen.....	5
Abbildung 1-4: Modell der Rolle der Histonacetylierung auf die Osteogenese	10
Abbildung 4-1: Trps1 ist in distalen, proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten exprimiert.....	39
Abbildung 4-2: Die Negativkontrollen der Trps1 Färbung zeigen keine Hintergrundfärbung.	40
Abbildung 4-3: Trps1 wird leicht erhöht während der ATDC5 Differenzierung exprimiert.....	41
Abbildung 4-4: Hdac4 Protein wird in proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten und Osteoblasten exprimiert	42
Abbildung 4-5: Negativkontrollen der Hdac4 Färbung zeigen keine Hintergrundfärbung.....	43
Abbildung 4-6: Hdac4 wird kontinuierlich und konstant in differenzierenden ATDC5 Zellen exprimiert.....	44
Abbildung 4-7: Hdac6 ist in allen Chondrozyten und trabekulären Osteoblasten exprimiert.	45
Abbildung 4-8: Negativkontrollen der Hdac6 Färbung zeigen keine Hintergrundfärbung.....	46
Abbildung 4-9: Die Hdac6 Expression startet an Tag 7 der ATDC5 Differenzierung	46
Abbildung 4-10: Trps1 und Hdac4 interagieren auf Proteinebene.....	49
Abbildung 4-11: Trps1 und Hdac6 interagieren auf Proteinebene.....	51
Abbildung 4-12: Trps1 reduziert die H3K9 und H3K18 Acetylierung	52
Abbildung 4-13: Trps1 Verlust resultiert in einer Histon Hyperacetylierung	53
Abbildung 4-14: In Trps1 defizienten Mäusen sind Histone hyperacetyliert.	53
Abbildung 4-15: Trps1 und Hdac4 sind in HEK293 EBNA Zellen überexprimiert.....	54
Abbildung 4-16: Trps1 aktiviert Hdac Proteine	55
Abbildung 4-17: Hdac Aktivität in Arm-Extrakten von Wildtyp und Trps1 defizienten Mäusen	56
Abbildung 4-18: Trps1 ist in HEK293 EBNA Zellen überexprimiert und Hdac Proteine herunterreguliert.....	58
Abbildung 4-19: Hdac1 siRNA senkt die Trps1 abhängige Hdac Aktivitätserhöhung	59
Abbildung 4-20: Hdac4 siRNA senkt die Trps1 abhängige Hdac Aktivitätserhöhung	60
Abbildung 4-21: Die ATDC5 Differenzierung lässt sich durch Hdac und HAT Inhibitoren beeinflussen.	62
Abbildung 4-22: Hdac Inhibitoren verstärken, HAT Inhibitoren reduzieren die ATDC5 Differenzierung.....	63
Abbildung 4-23: Acetyliertes Tubulin ist während der ATDC5 Differenzierung konstant exprimiert.....	65
Abbildung 4-24: Die H3K9 Acetylierung ändert sich während der ATDC5 Differenzierung. ...	66
Abbildung 4-25: Trps1 kommt in Proteinkomplexen zwischen 307 und 687 kDa vor.....	68
Abbildung 4-26: Hdac4 tritt in Proteinkomplexen zwischen 146 und 687 kDa auf.....	68
Abbildung 4-27: Hdac1 kommt in Komplexen zwischen 272 und 646 kDa und 66 und 79 kDa vor.....	69

Abbildung 4-28: Hdac6 tritt im Komplexen zwischen 176 und 687 kDa auf.	69
Abbildung 4-29: Aktin ist in Proteinkomplexen zwischen 48 und 74 kDa nachzuweisen.	70
Abbildung 4-30: Potentielle Trps1 Interaktionsproteine.	71
Abbildung 4-31: Potentielle Trps1 Interaktoren.	73
Abbildung 4-32: Trps1 und HSP90 interagieren verstärkt in proliferierenden ATDC5 Zellen.	74
Abbildung 5-1: Modell: Trps1 reguliert zusammen mit Hdac1 und 4 die Mitose.....	80

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Programme zum Einbetten von Extremitäten.	29
Tabelle 3-2: Deparaffinisierungs-Arbeitsschritte.	30
Tabelle 4-1: <i>Peptide Mass Fingerprint</i> nach Co-IP mit überexprimiertem Trps1 (1. Co-IP).....	72
Tabelle 4-2: <i>Peptide Mass Fingerprint</i> nach Co-IP mit überexprimiertem Trps1 (2. Co-IP).....	72
Tabelle 4-3: <i>Peptide Mass Fingerprint</i> nach Co-IP mit endogenem TRPS1.....	73
Tabelle 9-1: Pixel Messung der H3K9 und H3K18 Acetylierung in Trps1 Wildtyp und mutanten Mäusen.....	100
Tabelle 9-2: Hdac Aktivität nach Trps1 und Hdac4 Expression	100
Tabelle 9-3: Hdac Aktivität in Arm-Extrakten von Wildtyp Mäusen und Trps1 Mutanten....	101
Tabelle 9-4: Hdac Aktivität nach Trps1 und Hdac1 siRNA Transfektion	101
Tabelle 9-5: Hdac Aktivität nach Trps1 und Hdac2, 4 und 6 siRNA Transfektion	101
Tabelle 9-6: Auswertung der ATDC5 Differenzierung in Abhängigkeit von Hdac und HAT Inhibitoren.....	102

1. Einleitung

1.1. Das Vertebratenskelett

Das Skelett der Vertebraten ist ein mechanisches und endokrines Organ mit verschiedenen Aufgaben. Es dient als Bestandteil des muskuloskelettalen Systems der Bewegung, schützt die inneren Organe, bietet eine Nische für Zellen der Blutbildung, sowie des Immunsystems und reguliert den Mineralienhaushalt, Metabolismus und die männliche Fertilität (Lee et al., 2007; Oury et al., 2011; Quarles, 2008; Yin and Li, 2006). Das Skelett wird in ein kraniales, ein axiales und ein appendikuläres Skelett unterteilt, wobei die Wirbelsäule und die Rippen das axiale, der Schädel das kraniale und die oberen und unteren Extremitäten das appendikuläre Skelett bilden (Kaufmann, 1992). Die Extremitäten sind über den Schulter- bzw. Beckengürtel mit dem axialen Skelett verbunden. Die in dieser Arbeit untersuchten Entwicklungsprozesse wurden hauptsächlich in Zellen der Vorderextremitäten der Maus analysiert, so dass nur der Aufbau dieser genauer erläutert wird. Die Vordergliedmaßen setzen sich aus der Scapula (Schulterblatt), dem Humerus (Oberarmknochen), den beiden Unterarmknochen Ulna (Elle) und Radius (Speiche), sowie den Knochen der Hand, bestehend aus Carpus (Handwurzel), Metacarpus (Mittelhand) und den Phalangen (Fingerknochen), zusammen (Abbildung 1-1) (Kaufmann, 1992). Die Ulna und der Radius fanden bei der Analyse der Chondrozyten Differenzierung das Hauptaugenmerk.

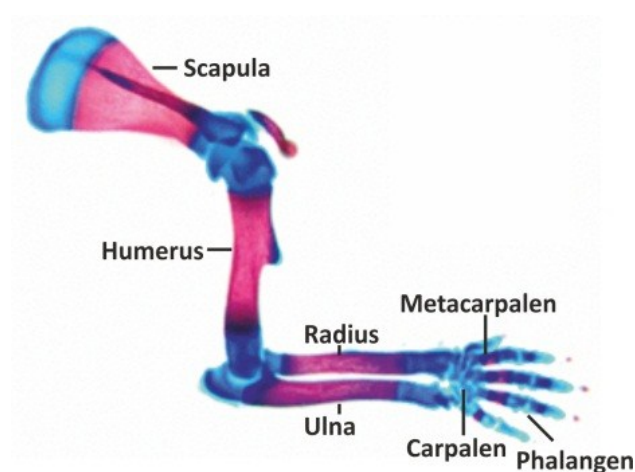


Abbildung 1-1: Vorderextremität der Maus

Dargestellt sind die Knochen der Vordergliedmaßen einer Maus. (Verändert nach E. Zelzer).

Eine gesunde Skelettentwicklung, sowie eine Erhalt eines funktionellen Skeletts im Alter, sind essential für die Gesamtgesundheit und die Lebensqualität. Die Skelettentwicklung und Regeneration folgt prinzipiell zwei Prozessen, die während der embryonalen Entwicklung beginnen. Zum einen der desmalen, und zum anderen der enchondralen Knochenentwicklung. Im Folgenden werden beide Prozesse beschrieben.

1.1.1. Desmale Knochenentwicklung

Die Knochen des Schädeldachs, die meisten Gesichtsknochen und Teile des Schlüsselbeins entwickeln sich nach dem Prinzip der desmalen Ossifikation. Hierbei kondensieren mesenchymale Zellen inselartig und bilden die Vorläuferzellen des späteren Knochens. Diese Zellen differenzieren dann zu Osteoblasten und sezernieren die mineralisierende Knochenmatrix (Osteoid). Die so entstandenen, inselartigen Knochenbereiche dehnen sich aus und verbinden sich zum späteren Knochen.

1.1.2. Enchondrale Knochenentwicklung

Rippen, Wirbel und langen Röhrenknochen, wie z.B. Arm- und Beinknochen, entwickeln sich durch den Prozess der enchondralen Ossifikation. Bei diesem mehrstufigen und streng regulierten Prozess wird der Knochen über eine Knorpelzwischenstufe, bestehend aus Chondrozyten, gebildet (Abbildung 1-2) (Hall and Miyake, 2000; Kronenberg, 2003; Mariani and Martin, 2003; Wuelling and Vortkamp, 2010, 2011). Mesenchymale Zellen kondensieren am Ort des späteren Knochens und differenzieren in Chondrozyten, die eine Vorlage des Knochens bilden. Die Chondrozyten sezernieren eine knorpelspezifische Matrix, bestehend aus Proteoglykanen und Kollagenfibrillen, die für die Festigkeit und Elastizität der Knorpelanlagen verantwortlich sind. Um die Chondrozyten herum bildet sich das Perichondrium, das aus fibroblasten-ähnlichen Zellen besteht und über verschiedene Signaltransduktionskaskaden mit den Chondrozyten in Verbindung steht. Die Chondrozyten differenzieren in unterschiedliche Subpopulationen. Zum einen in kleine rundliche, langsam proliferierende Chondrozyten an den Enden der Anlagen, und zum anderen in stark proliferierende, kolumnare Chondrozyten im Zentrum der Knorpelanlage. Die kolumnaren Chondrozyten sind stapelförmig angeordnet, teilen sich stark und sorgen so für eine Längenzunahme der Anlagen. Der Kollagenbestandteil der Knorpelmatrix wird im Bereich

der proliferierenden Chondrozyten vom Typ-II-Kollagen gebildet (Bi et al., 1999). Des Weiteren werden spezifische Proteine, wie der Transkriptionsfaktor *SRY-box containing gene 9* (Sox9), exprimiert (Ng et al., 1997; Wright et al., 1995; Zhao et al., 1997). Im Zentrum der Knorpelanlage stoppen die Chondrozyten die Proliferation und beginnen sich weiter zu differenzieren. Die Zellen nehmen an Größe zu und werden als prähypertrophe Chondrozyten bezeichnet. Ein Markerprotein für diese Zellen ist *Indian Hedgehog* (Ihh) (St-Jacques et al., 1999; Vortkamp et al., 1996). Die prähypertrophen Chondrozyten nehmen an Größe zu, was eine weitere Längenzunahme der Anlage bewirkt. Die prähypertrophen Chondrozyten differenzieren zu hypertrophen Chondrozyten, die Typ-X-Kollagen sezernieren (Elima et al., 1993; Olsen et al., 2000) und die maximale Größe erreicht haben. Parallel zur hypertrophen Zone, differenzieren die Zellen des Perichondriums im hypertrophen Bereich zu Osteoblasten. Dieser Bereich wird dann Periost (Knochenhaut) genannt. Im letzten Schritt der hypertrophen Differenzierung differenzieren die hypertrophen Chondrozyten zu terminal hypertrophen Chondrozyten, sezernieren die Matrix Metalloproteinase 13 (Mmp13) (Gack et al., 1995) und sterben durch Apoptose ab. Mmp13 verdaut im hypertrophen Bereich Kollagene, startet so den Abbau der Knorpelmatrix und schafft Freiräume für die aus dem Periost einwandernden Blutgefäße, Osteoblasten und Osteoklasten, die den trabekulären Knochen bilden. Osteoklasten bauen die Knorpelmatrix weiter ab, die Osteoblasten hingegen sezernieren eine knochenspezifische Matrix. Von diesem primären Ossifikationszentrum breitet sich die Ossifikation in Richtung der Gelenke aus, so dass fast alle Chondrozyten und die Knorpelmatrix gegen Osteoblasten und Osteoklasten, sowie mineralisierter Knochenmatrix ausgetauscht werden. Postnatal bildet sich im Bereich der Gelenke ein zweites, sekundäres Ossifikationszentrum, wobei eine Zone aus proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten zwischen den beiden Ossifikationszentren erhalten bleibt und als Wachstumsfuge bezeichnet wird. Diese Zone dient postnatal der Längenzunahme des Knochens, wobei sie während der Osteogenese immer kürzer wird und sich beim Menschen in der Pubertät schließt. Bei der Maus bleibt die Wachstumsfuge erhalten, ohne dass der Knochen gravierend an Größe zunimmt. Während der Umbildung von Knorpel in Knochen breitet sich auch das Periost vom Zentrum des Knochens aus und umgibt als Knochenhaut den Knochen.

Die enchondrale Ossifikation ist ein Prozess, bei dem mehrere Differenzierungsschritte unterschiedlicher Zellarten stattfinden. Jeder Differenzierungsschritt und jede Zellart hat ein

anderes genetisches Programm. Diese Änderungen im genetischen Programm werden durch spezifische Signaltransduktionskaskaden und folglich der Aktivität unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren und Chromatinmodifikatoren gesteuert. Es gibt dabei Transkriptionsfaktoren und Chromatinmodifikatoren, die generell in allen Zellen vorkommen, aber auch solche, die Zelltyp- bzw. Differenzierungs-spezifisch sind. Einige, für diese Arbeit wichtige Faktoren, werden im Folgenden beschrieben.

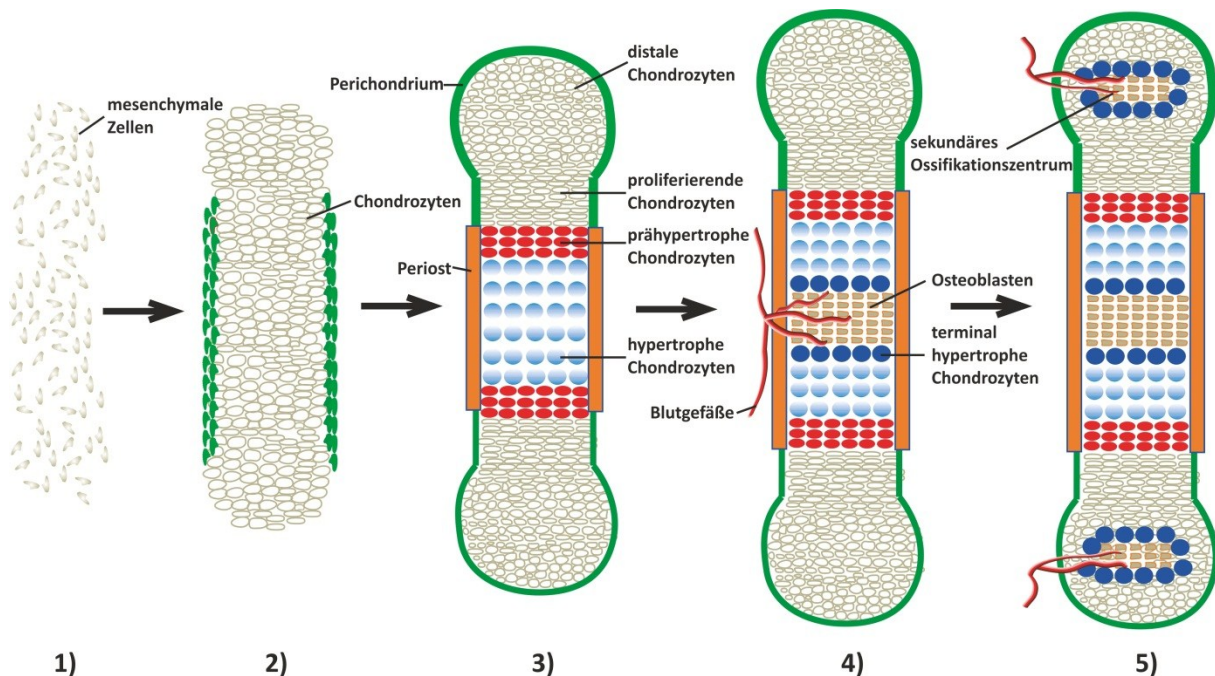


Abbildung 1-2: Darstellung der enchondrale Ossifikation

Mesenchymale Zellen (spindelförmige, graue Zellen) kondensieren (1) und differenzieren zu Chondrozyten (runde, graue Zellen), die die Anlage des zukünftigen Knochens bilden (2). Um die Anlage herum formt sich das Perichondrium (grün) (2-3). Die Chondrozyten differenzieren von distalen zu kolumnaren, proliferierenden und im Zentrum erst zu prähypertropen (rote Zellen) und dann weiter zu hypertropen (hellblaue Zellen) Chondrozyten. Im hypertrophen Bereich differenzieren die Zellen des Perichondriums zu Osteoblasten und bilden das Periost (orange) (3). Im Zentrum differenzieren hypertrophe Chondrozyten in terminal hypertrophe (dunkelblaue Zellen) Chondrozyten, die dann durch Osteoblasten (braune Zellen), die zusammen mit den Blutgefäßen (rot) einwandern ersetzt werden (4). In den distalen Bereichen bilden sich sekundäre Ossifikationszentren, die die Wachstumsfugen bilden (5). (Verändert nach M.Wuelling).

1.2. Der Transkriptionsfaktor Trps1

Der Transkriptionsfaktor Trps1 besteht aus 1281 Aminosäuren und enthält in seiner Sequenz neun putative Zinkfinger (Abbildung 1-3). Die ersten sechs Zinkfinger weisen je eine C₂H₂ Konsensussequenz auf. Der siebte Zinkfinger gehört zur GATA-Typ Familie und hat vor allem eine DNA bindende Funktion. Die beiden C-Terminalen Zinkfinger werden der Ikaros Familie zugeordnet und dienen genau wie die Zinkfinger 4-6 der Interaktion mit anderen Proteinen. Es ist beschrieben, dass Trps1, aufgrund der Aktivität der beiden C-terminalen Ikaros Zinkfinger, als transkriptioneller Repressor wirkt (Kaiser et al., 2007; Kaiser et al., 2003a; Kaiser et al., 2003b; Malik et al., 2001; Wuelling et al., 2009). Den ersten drei Zinkfingern konnte bisher keine Funktion zugeordnet werden.

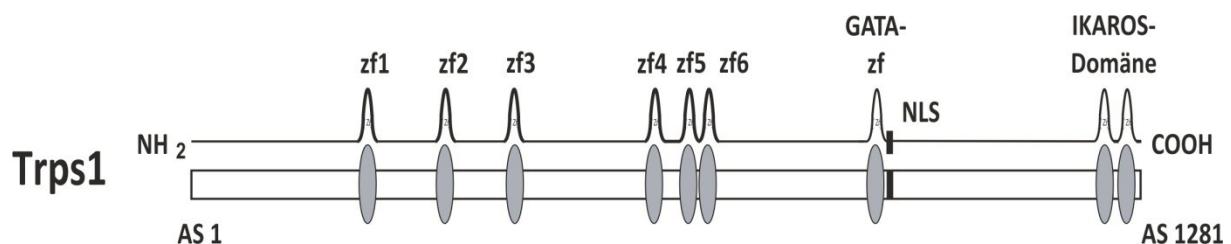


Abbildung 1-3: Modell der Trps1 Domänen

AS: Aminosäure; zf1-6: Zinkfinger 1-6; GATA-zf: GATA-Typ Zinkfinger; NH₂: Amino (N)-Terminus; COOH: Carboxy (C)-Terminus. Trps1 besteht aus 1281 Aminosäuren. In der Struktur sind neun Zinkfinger vorhergesagt. Die ersten Sechs weisen eine C₂H₂ Konsensussequenz auf, der Siebte ist vom GATA-Typ und Zinkfinger Acht und Neun sind vom IKAROS-Typ. (Verändert nach F.Kaiser)

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass Mutationen im *TRPS1* Gen für das „Tricho-Rhino-Phalangeale Syndrom“ verantwortlich sind. Das „Tricho-Rhino-Phalangeale Syndrom“ ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die sich vor allem in einer gestörten Entwicklung der Haare und der Gesichts- und Röhrenknochen niederschlägt. Diese Entwicklungsdefekte resultieren in Missbildungen des Gesichts, in Kleinwuchs und einem frühzeitigen Verschluss der Wachstumsfuge (Momeni et al., 2000).

Unsere und andere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass Trps1 unterschiedliche Schritte der Chondrozyten Differenzierung und Proliferation reguliert, und somit essentiell für eine akkurate Skelett Entwicklung ist (Itoh et al., 2008; Napierala et al., 2008; Suemoto et al., 2007; Wuelling et al., 2009).

Trps1 ist während der Gliedmaßen Entwicklung der Maus sehr stark an der Grenze zwischen proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten exprimiert (Fantauzzo et al., 2008; Kunath

et al., 2002). Homozygote *Trps1*^{-/-} Mutanten sind signifikant in der Größe reduziert, zeigen vor allem kürzere und schmalere Knochen und sterben perinatal aufgrund von Atemdefekten, die wohl durch eine schlechte Entwicklung des Brustkorbes hervorgerufen werden (Malik et al., 2002). Molekulare Analysen in *Trps1*^{-/-} Mutanten zeigten Proliferations- und Differenzierungsdefekte in Chondrozyten (Napierala et al., 2008; Suemoto et al., 2007; Wuelling et al., 2009). *Trps1*^{-/-} Mutanten zeigen eine signifikant reduzierte Proliferationsrate, die sich aber nicht in der Länge der Zone proliferierender Chondrozyten bemerkbar macht. Die Übergangszone zwischen proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten ist dagegen verlängert. Aus diesen beiden Tatsachen lässt sich schlussfolgern, dass *Trps1*^{-/-} Mutanten einen Defekt beim Austritt aus dem Zellzyklus aufweisen (Nishioka et al., 2008; Wuelling et al., 2009). *Trps1* hat demnach Funktionen sowohl in proliferierenden, als auch in hypertrophen Chondrozyten und reguliert dabei die Proliferationsrate und Differenzierung dieser Zellen.

Um diese Zelltyp-spezifischen Regulationen ausführen zu können, bildet *Trps1* Komplexe mit anderen Transkriptionsfaktoren. In Chondrozyten interagiert *Trps1* mit Transkriptionsfaktoren der Gli-Familie, die als transkriptionelle Regulatoren des *Ihh*-Signalweges fungieren (Wuelling et al., 2009). In Osteoblasten konnte eine Interaktion von *Trps1* und *Runx2*, dem Hauptaktivator der Osteoblasten Differenzierung, nachgewiesen werden (Napierala et al., 2005; Napierala et al., 2008). Weiterhin ist bekannt, dass *Runx2* mit Proteinen der Histondeacetylase (Hdac) Familie interagieren kann (Jensen et al., 2008; Schroeder et al., 2004; Vega et al., 2004; Westendorf, 2007; Westendorf et al., 2002). Hier sind vor allem *Hdac1* und *Hdac4* erwähnenswert, da beide direkt die *Runx2* Aktivität und somit die enchondrale Differenzierung inhibieren können. Vorausgegangene *Yeast-two-Hybrid* Studien liefern Hinweise auf eine Verbindung zwischen *Trps1* und Hdac Proteinen (Kaiser, F., Universität Lübeck, nicht veröffentlicht), so dass vermutet werden kann, dass *Trps1* über Hdac Proteine, und hier vor allem mittels *Hdac4*, die enchondrale Ossifikation reguliert.

1.3. Histondeacetylasen in Differenzierungsprozessen

Eine Zelltyp-spezifische Genexpression ist wichtig, um die unterschiedliche phänotypische Erscheinung von Zellen zu gewährleisten. Zellen, die proliferieren, haben demnach eine

andere Proteinausstattung, als Zellen, die differenzieren bzw. differenziert sind. Die unterschiedliche Proteinexpression kann in der Zelle durch mehrere Mechanismen reguliert werden. So sind z.B. Zelltyp-spezifische Transkriptionsfaktoren oder Chromatinmodifikatoren an der differenzierten Genexpression verschiedener Zelltypen beteiligt. Chromatinmodifikatoren agieren epigenetisch, d.h. nicht auf dem Level der reinen DNA-Sequenz, sondern über eine chemische Modifikation der DNA und der Histonproteine, um die die DNA gewickelt und somit verpackt ist. Diese epigenetischen Prozesse können z.B. DNA Methylierung, Histonacetylierung, -methylierung, -phosphorylierung und -sumoylierung sein.

Diesen Prozessen ist gemeinsam, dass mittels einer chemischen Modifikation, entweder der DNA oder der Histone, zum einen die Interaktion zwischen DNA und Histonproteinen oder zum anderen die Affinität der Bindung, von z.B. Transkriptionsfaktoren an das Chromatin, beeinflusst wird. So schaffen z.B. Methylierungen von DNA zusätzliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, während die Acetylierung von Histonen, über das Einbringen von zusätzlichen negativen Ladungen auf der Oberfläche der Histone, eine Auflockerung der Interaktion von negativ geladener DNA und Histonen bewirkt. Diese Auflockerung sorgt für eine Öffnen des Chromatins, wodurch eine stärkere Transkription und somit Proteinexpression stattfinden kann. Diese Modifikationen können zelltyp-spezifisch an verschiedenen Genen eine differenzierte Expression bewirken. Für diese Arbeit sind die epigenetischen Chromatinmodifikatoren der Klasse der Histondeacetylasen (Hdacs) von Bedeutung, da ihnen eine Rolle bei der Regulation der Genexpression in verschiedenen Differenzierungsprozessen zugeordnet wird.

Hdacs sind Lysin Deacetylasen, die eine negativ geladene Acetylgruppe ($\text{CH}_3\text{CO}-$) von der ϵ -Aminogruppe der Lysine von Histonen oder anderen Proteinen, wie z.B. Transkriptionsfaktoren (Choudhary et al., 2009; Glozak et al., 2005; Jeon et al., 2006; Lee et al., 2007) oder Hitzeschock Proteinen (Ai et al., 2009; Basak et al., 2008; Kekatpure et al., 2009; Kovacs et al., 2005), entfernen und somit eine positiv geladene Seitengruppe zurücklassen. Im Falle der Histone bewirkt diese Deacetylierung zum einen eine Strukturänderung, so dass Transkriptionsfaktoren, die eine Histon-bindende Bromodomäne besitzen, nicht mehr binden können. Zum anderen wird eine stärkere Interaktion der positiven Lysine mit der negativen DNA bewirkt, welches zu kompakterem und kondensiertem Chromatin und einer transkriptionellen Repression führt. Im Falle der Nicht-

Histonproteine kann eine Deacetylierung zu einer Modifikation von Protein-Protein Interaktionen führen, wodurch die Stabilität, Aktivität oder zelluläre Lokalisation beeinflusst wird (Ai et al., 2009; Basak et al., 2008; Choudhary et al., 2009; Glozak et al., 2005; Jeon et al., 2006; Kekatpure et al., 2009; Kovacs et al., 2005; Lee et al., 2006). Die enzymatischen Gegenspieler der Hdacs sind die Histon Acetyl Transferasen (HATs). Diese Proteine modifizieren die ϵ -Aminogruppe von Lysinen anderer Proteine, wie z.B. Histone oder Transkriptionsfaktoren, mit Acetylgruppen und haben somit den entgegengesetzten Effekt zu den Hdacs.

Im humanen Genom sind 18 Hdacs kodiert, welche anhand ihrer Struktur und Funktion in vier Klassen unterteilt sind. Die erste Klasse (I) setzt sich aus den Hdacs 1, 2, 3 und 8 zusammen. Diese Hdacs sind homolog zum *S. cerevisiae* Protein Rpd3. Sie sind in den meisten Geweben und Zellen ubiquitär exprimiert und hauptsächlich im Nukleus lokalisiert (Chini et al., 2010; de Ruijter et al., 2003; Yang et al., 2002). Die Hdacs 4, 5, 6, 7, 9 und 10 bilden die zweite Klasse (II), wobei sie zu dem *S. cerevisiae* Protein Hda1 homolog sind (de Ruijter et al., 2003). Sie weisen eher ein Zelltyp-spezifisches Expressionsprofil auf, spielen eine wichtige Rolle in differenzierungsspezifischen Programmen und translozieren zwischen Nukleus und Zytoplasma, wodurch ihre Aktivität reguliert wird (Vega et al., 2004). Hdac6 und 10 bilden die Unterklasse IIb, da sie die einzigen Hdacs mit zwei katalytischen Domänen sind. Klasse III setzt sich aus den NAD^+ -abhängigen Sirtuinen (Sirts) zusammen. Hdac 11 besitzt Gemeinsamkeiten mit den ersten beiden Klassen und bildet die Klasse IV. Für die enchondrale Ossifikation sind die ersten beiden Klassen relevant.

Die Hdacs 1, 3 und 7 scheinen eine wichtige Funktion in der Kondensation mesenchymaler Zellen zu haben, da Deletionen dieser Hdacs in der frühen Embryogenese letal sind (Bhaskara et al., 2008; Chang et al., 2006; Lagger et al., 2002). Deletionen der Hdacs 2, 4, 5, 6, 8 und 9 führen zu einer frühen enchondralen Ossifikation (Chang et al., 2004; Trivedi et al., 2007; Vega et al., 2004). Hdac1 assoziiert mit Transkriptionsfaktoren, die wichtig für Differenzierungsprozesse sind. Dazu gehört z.B. Nkx3.2, ein Repressor der Transkription, der für die Bildung der Knorpelanlagen wichtig ist (Murtaugh et al., 2001; Zeng et al., 2002). Hdac1 reprimiert auch den BMP-Signalweg, um die Bmp2 Aktivität zu kontrollieren. Bmp2 ist ein wichtiger chondrogener Faktor (Kim and Lassar, 2003). Weiterhin spielt Hdac1 eine wichtige Rolle in der Osteoblasten Differenzierung, da Hdac1 mit dem Hauptregulator Runx2 interagiert. Runx2 und die DNA seiner Zielgene werden deacetyliert (Abbildung 1-4) und

dadurch die transkriptionelle Aktivität senkt (Lee et al., 2006). Hdac1 reguliert auch die Expression von extrazellulären Matrix (ECM) Proteinen des Knorpels, wie Aggrecan, Typ-II-Kollagen, Typ-IX-Kollagen und das Knorpel Oligomere Protein (Comp) (Hall and Miyake, 2000; Huh et al., 2007; Liu et al., 2004). Hdac2 ist ebenfalls an der Regulation der Matrix Proteine Typ-II-Kollagen, Aggrecan und Typ-XI-Kollagen beteiligt (Hong et al., 2009). Obwohl Hdac1 und Hdac2 sowohl strukturell, als auch funktionell hoch homolog sind, ist die embryonale Sterblichkeit bei einem globalen Hdac2 *Knockout* in Mäusen deutlich geringer, als bei einer globalen Hdac1 Deletion (Trivedi et al., 2007). Wie genetische Deletionsanalysen gezeigt haben, spielen Hdac3 und Hdac4 eine wichtige Rolle in der Chondrozyten Reifung (Chang et al., 2004; Razidlo et al., 2010; Vega et al., 2004). Beide Hdacs interagieren mit den Transkriptionsfaktoren Runx2, Mef2, mit dem Co-Repressor Zfp521 und regulieren dadurch die Chondrozyten Hypertrophie (Correa et al., 2010; Razidlo et al., 2010; Vega et al., 2004). Eine komplette Hdac3 Deletion in Mäusen führt zu embryonalem Sterben, wohingegen ein konditionelle Deletion in Osteoblasten zu einer reduzierten Körpergröße führt, die durch eine verkürzte Wachstumszone, sowie einer breiteren hypertrophen Zone hervorgerufen wird (Razidlo et al., 2010). Weiterhin führt der Verlust von Hdac3 in Osteo-Chondro-Vorläuferzellen zu einer reduzierten Knochendichte und Osteoblasten Zellzahl (Razidlo et al., 2010). Eine Interaktion zwischen Hdac3 und Runx2 wird in Osteoblasten durch den Co-Repressor Zfp521 verstärkt, wodurch die Osteoblasten Differenzierung, sowie die Osteoblasten-abhängige Osteoklastogenese kontrolliert wird (Hesse et al., 2010). Hdac4 Deletionsmäuse sind lebensfähig, zeigen aber eine beschleunigte Chondrozyten Differenzierung und somit enchondrale Ossifikation (Vega et al., 2004). Das Fehlen von Hdac4 resultiert in einer höheren Ihh, Runx2 und Typ-II-Kollagen Expression im Bereich der Wachstumszone (Vega et al., 2004). Hdac4 bindet Runx2 und inhibiert die Runx2-abhängige Hypertrophie (Arnold et al., 2007; Vega et al., 2004). Der Co-Repressor Zfp521, der für die Regulation der Chondrozyten Proliferation wichtig ist, ist Bestandteil des Hdac4-Runx2 Repressor-Komplexes (Correa et al., 2010). Weiterhin inhibiert Hdac4 über die Aktivität des Transkriptionsfaktor Mef2 die Hypertrophie und Differenzierung der Chondrozyten (Arnold et al., 2007; Vega et al., 2004). Hdac4 reguliert über die Runx2-abhängige Expression von Mmp13 die Osteoblasten Reifung (Shimizu et al., 2010). Hdac6 reguliert ebenfalls über eine Interaktion mit Runx2 die Genexpression in Osteoblasten, wobei die Verweildauer von Hdac6 im Nukleus relativ kurz ist (Jensen et al., 2009; Jensen et al., 2008; Westendorf et al.,

2002). Der Verlust von Hdac6 resultiert in einer geringen Erhöhung der trabekulären Knochendichte (Zhang et al., 2008). Auch die Hdacs 5 und 7 interagieren mit Runx2 und sind an Mechanismen der Genexpression und zellulären Lokalisation in Osteoblasten beteiligt (Jensen et al., 2009; Westendorf, 2006).

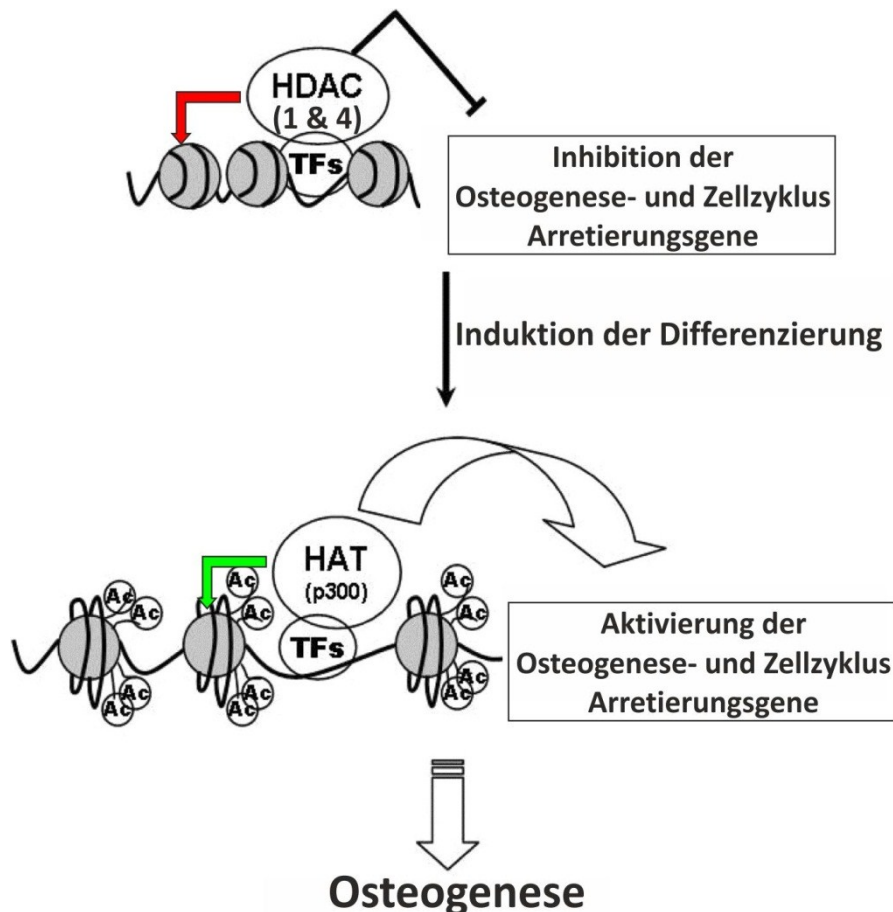


Abbildung 1-4: Modell der Rolle der Histonacetylierung auf die Osteogenese

Hdacs, vor allem 1 und 4, binden über spezifische Transkriptionsfaktoren (TFs) an das Chromatin und deacetylieren Histone (roter Pfeil). Dieses führt zu kompaktem Chromatin und nicht transkribierten Genen der Osteogenese und Genen, die für den Zellzyklusarrest verantwortlich sind. Wird die Osteogenese und somit die Differenzierung induziert, binden HATs (z.B. p300) über TFs an das Chromatin und acetylieren Histone (grüner Pfeil). Dieses führt zu offenem Chromatin und zur Transkription von Genen der Chondrozyten und Osteoblasten Differenzierung und des Zellzyklusarrestes und somit zur enchondralen Ossifikation. Über diese Veränderung auf Chromatinebene kann die Osteogenese reguliert werden. (Verändert nach (Lee et al., 2006)).

1.4. Mitoseregulation durch Histondeacetylasen

Den Histondeacetylasen kommt auch eine entscheidende Rolle in der Regulation der Mitose zu. Dieses ist für die enchondrale Ossifikation von Bedeutung, da sowohl die Proliferation, als auch die Differenzierung von Chondrozyten, Zellzyklus- und somit auch Mitose-abhängig ist. Der Ablauf des Zellzyklus wurde in Chondrozyten analysiert und es wurde vor allem einige Regulatoren des Eintritts in die S-Phase identifiziert (Beier, 2005). Über den Übergang in die G2-Phase oder den Ablauf der Mitose in Chondrozyten ist bisher wenig bekannt. Chromatin Modifizierende Enzyme wie HATs und Hdacs haben bei diesen Prozessen eine wichtige Funktion. So regulieren sie unter anderem die Replikation, Chromosomen Kondensation und auch die Chromosomen Segregation. HATs und Hdacs regulieren dieses über die Anheftung (HATs) bzw. Entfernung (Hdacs) der Acetylgruppen an/von den N-terminalen Schwänzen der Histone. Während der Mitose ist es wichtig, dass das Chromatin in einem sehr kompakten, kondensierten Zustand vorliegt, so dass die Schwesterchromatiden zusammenhaften (Kruhlak et al., 2001). Mittels chemischer Inhibition von Hdac Proteinen und Hdac Deletionsstudien wurde festgestellt, dass eine Histondeacetylierung für die mitotische Zellteilung relevant ist (Gabrielli et al., 2011; Park et al., 2011). Eine gestörte Histondeacetylierung in Zellen führt zur Aktivierung des Mitose Kontrollpunktes und zum Arrest in der Prophase (Cimini et al., 2003; Robbins et al., 2005). In Zellen, die diesen Checkpoint umgehen, häufen sich falsch angeordnete Chromosomen an, was zu Aneuploidien führt (Ishii et al., 2008; Magnaghi-Jaulin et al., 2007). Auch die Deacetylierung anderer Proteine, wie z.B. Tubulin, spielt beim Ablauf der Mitose eine wichtige Rolle, da die Mikrotubulidynamik über Deacetylierung reguliert wird (Boyault et al., 2007; Clarke et al., 2011; Haggarty et al., 2003; Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002; Valenzuela-Fernandez et al., 2008). Mikrotubuli sind für den Aufbau der Spindel und die Trennung der Schwesterchromatiden von großer Bedeutung. Somit können Hdac Proteine über eine Regulation des Zellzyklus und der Mitose eine wichtige Rolle bei der Regulation der Proliferation und Differenzierung während der enchondralen Ossifikation spielen.

1.5. Hitzeschock Proteine und Chromatin bzw. Histondeacetylasen

Hitzeschock Proteine (Hsp) übernehmen in Zellen die Funktion der Faltungshelfer (Chaperone) für andere Proteine. Dabei regulieren sie den Proteinhaushalt der Zelle und wirken somit zytoprotektiv. Bei physiologischen Zellbedingungen sorgen Hitzeschock Proteine unter anderem dafür, dass Proteine während der Synthese direkt richtig gefaltet werden. Bei unphysiologischen Zellbedingungen, die z.B. durch hohe Temperatur, wenig Sauerstoff, Ethanol, ultravioletter Strahlung oder anderen Zellstress hervorgerufen werden können, stabilisieren Hsp andere Proteine und verhindern so die Denaturierung dieser Proteine oder beschleunigen den Abbau falsch gefalteter Proteine im Proteasom. Dabei sorgen sie dafür, dass die Zelle weiter funktionsfähig bleibt. Die wichtigsten Chaperone sind Hsp90, Hsp70 und die Chaperonine. Für diese Arbeit ist Hsp90 von Bedeutung, so dass im Folgenden nur näher auf Hsp90 eingegangen wird. Dabei wird hauptsächlich die Funktionen von Hsp90 beschrieben werden, die sich nicht in erster Linie auf die Chaperonfunktion beziehen.

Hsp90 hat eine Größe von 90 kDa und ist das am häufigsten in der Zelle vorkommende Chaperon, sowohl unter physiologischen, als auch unter Stressbedingungen. Hsp90 kann mit spezifischen Proteinen, wie z.B. Steroid Hormon Rezeptoren, Proteine verschiedener Signal Transduktionskaskaden oder Transkriptionsfaktoren interagieren, deren Aktivität durch Wachstumssignale gesteuert werden können (Calderwood et al., 2006; Tariq et al., 2009). Es gibt einige Hinweise, dass Hsp90 bei der transkriptionellen Regulation der Genexpression beteiligt ist (Floer et al., 2008; Freeman and Yamamoto, 2002; Hong et al., 2009). Außerdem konnte eine Interaktion von Hsp90 mit Histonproteinen nachgewiesen werden, so dass angenommen werden kann, dass Hsp90 auch die Chromatinstruktur und Chromatinorganisation regulieren kann (Csermely et al., 1994; Schnaider et al., 1999). Hsp90 hat eine stabilisierende und somit aktivierende Wirkung auf Trithorax Gruppen Komplex (TrxG) Proteine. TrxG Proteine induzieren eine Histon 3 Lysin 4 Tri-Methylierung, die eine Aktivierung von Chromatin und somit eine stärkere Genexpression bewirkt. Hsp90 hat demnach eine aktivierende Wirkung auf die Genexpression. Der Verlust von Hsp90 führt zu einer Aktivierung von Polycomb Gruppen Komplex (PcG) Proteinen. PcG Proteine bewirken über eine Histon 3 Lysin 27 Tri-Methylierung eine Repression des Chromatins und somit eine Inhibition der Genexpression von Zielgenen (Ruden and Lu, 2008; Tariq et al., 2009).

Weiterhin hat Hsp90 eine Zytoplasmatische Funktion, die die Lokalisation des Androgenrezeptors (AR) reguliert. Dabei wird die Acetylierung von Hsp90 durch Hdac6 moduliert. Stark acetyliertes Hsp90 hat eine geringe Affinität zum AR, der dann ubiquitiniert und degradiert wird. Wird Hsp90 durch Hdac6 aber deacetyliert, steigt die Affinität zum AR und AR wird stabilisiert. Weiterhin wird durch die Interaktion mit Hsp90 die Translokation von AR, nach Induktion durch den Liganden Dihydrotestosteron (DHT), in den Nukleus gefördert (Ai et al., 2009; Basak et al., 2008; Kovacs et al., 2005). Eine ähnliche Funktion hat Hsp90 im Zusammenspiel mit Hdac6 auf die Lokalisation des Aryl-Hydrocarbon Rezeptor (AhR). AhR wird durch polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe aktiviert, transloziert in den Nukleus und aktiviert Zielgene. Hyperacetyliertes Hsp90 bewirkt eine geringere AhR Aktivität im Nukleus. Wird Hsp90 von Hdac6 deacetyliert, steigt dagegen die nukleäre AhR Translokation und Aktivität (Kekatpure et al., 2009).

2. Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten molekulare und funktionelle Eigenschaften des Multi-Zinkfinger Transkriptionsfaktors Trps1 aufgeschlüsselt werden. Dieses sollte im Prozess der enchondralen Ossifikation, in dem Trps1 eine wichtige, bisher aber noch wenig erforschte Rolle hat, geschehen. Es ist bekannt, dass Trps1 die Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten reguliert (Napierala et al., 2008; Suemoto et al., 2007; Wuelling et al., 2009) und sehr stark an der Grenze zwischen proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird (Fantauzzo et al., 2008; Kunath et al., 2002). Wie Trps1 die Chondrozyten Proliferation und Differenzierung reguliert ist aber weitgehend unbekannt. Es wird vermutet, dass Trps1 als Transkriptionsfaktor Co-Faktoren benötigt, um in unterschiedlichen Chondrozytenpopulationen, unterschiedliche genetische Programme regulieren zu können. Als Co-Faktoren von Trps1 kommen Hdac Proteine in Frage, da besonders Hdac4 an ähnlichen Schritten der Chondrozyten Proliferation und Differenzierung regulatorisch beteiligt ist (Vega et al., 2004). Trps1 und einige Hdac Proteine (vor allem Hdac4 und Hdac6) haben auch den gemeinsamen Interaktionspartner Runx2, der als Hauptregulator der enchondralen Ossifikation gilt (Bradley et al., 2011; McGee-Lawrence and Westendorf, 2011; Vega et al., 2004; Westendorf, 2006; Westendorf et al., 2002). Weiterhin konnte aus ersten Interaktionsstudien geschlossen werden, dass Trps1 zumindest mit den Hdacs 1 und 2 interagieren könnte.

In dieser Arbeit sollte mittels Co-Immunpräzipitationsstudien analysiert werden, ob Hdacs auf Proteinebene mit Trps1 interagieren können. Als erste Kandidaten galten Hdac4 und Hdac6. Auch sollte der Einfluss von Trps1 auf die Aktivität von Hdac Proteinen *in vivo* und *in vitro* untersucht werden. Hierfür sollten Zellextrakte von Wildtyp und Trps1 defizienten Mäusen, sowie Extrakte von Trps1 und Hdac4 überexprimierenden Zellen in Zellkultur verglichen werden. Mittels dieser Analyse sollten Rückschlüsse gezogen werden, welche Rolle Trps1 in Verbindung mit Hdacs in der Chondrozyten Differenzierung hat und wie Trps1 auf molekularer Ebene die Proliferation und Differenzierung reguliert.

Um weitere molekulare Funktionen von Trps1 aufzuschlüsseln, sollten unbekannte Interaktionsproteine, die die Zelltyp-spezifischen Regulationsmechanismen von Trps1 während der Chondrozyten Differenzierung vermitteln, mittels Co-Immunpräzipitation und anschließender massenspektrometrischer Analyse identifiziert werden. Aufgrund eines

Interaktionsprofils von Trps1 und dessen Interaktionspartner könnten weitere molekulare Funktionen von Trps1 in der enchondralen Ossifikation abgeleitet werden.

Weiterhin sollten in der chondrogenen ATDC5 Zelllinie Differenzierungsprozesse nach Hdac Inhibition und Inhibition von Histon Acetyl Transferasen (HAT) analysiert werden. Auch sollte das Histon H3 Acetylierungsprofil im Zuge der ATDC5 Differenzierung analysiert werden, um die molekulare Funktion von Hdac Proteinen während Differenzierungsprozessen genauer bestimmen zu können. Hier stellte sich die Frage, ob Hdac Proteine über die Histondeacetylierung die Differenzierung beeinflussen oder evtl. über die Deacetylierung anderer Proteine wirken.

3. Material und Methoden

3.1. Arbeitsvorbereitungen

Alle Puffer und Nährmedien wurden mit „Milli Q“-gereinigtem Wasser hergestellt. Die meisten Puffer wurden als konzentrierte Stammlösungen angesetzt. Angegebene Konzentrationsangaben beziehen sich auf die jeweiligen Endkonzentrationen. Puffer, Medien und andere Lösungen wurden autoklaviert oder, falls hitzelabile Bestandteile enthalten waren, mittels Filtration sterilisiert. Pipettenspitzen, Eppendorf-Reagenzgefäße, Glasgeräte und Metallgeräte wurden ebenfalls durch Autoklavieren sterilisiert. Falcon-Reagenzgefäße, 5, 10 und 25 ml Pipetten und alle Utensilien für die Zellkultur waren gamma-sterilisierte Einwegmaterialien. Alle Zellkulturarbeiten wurden in einem S1-Zellkulturlabor mit Umluftstrom-Sterilbank durchgeführt. Versuche mit genetisch veränderten Organismen wurden im S1-Labor durchgeführt. Die folgenden beschriebenen Methoden und Arbeitstechniken basieren auf Protokollen des Instituts für Entwicklungsbiologie.

3.2. Material

Im Folgenden sind verwendete Chemikalien, Geräte, *Software*, Enzyme, Antikörper, Verbrauchsmaterialien, *Kits*, Bakterienstämme, Mausstämme und Zelllinien, sowie deren Bezugsquelle bzw. deren Hersteller aufgelistet. Des Weiteren sind die Zusammensetzungen von Lösungen, Puffern, Bakterien- und Zellkulturmedien, Plasmide und siRNA Oligonukleotide aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

3.2.1. Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Laborchemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Taufkirchen) bezogen, wenn es nicht anders angegeben ist.

Chemikalien	Bezugsquelle
Bacto-Agar	BD Diagnostic Systems (Heidelberg)
Bacto-Yeast Extract	BD Diagnostic Systems (Heidelberg)
Difco-Pepton	BD Diagnostic Systems (Heidelberg)
<i>DPX-Mounting Medium</i>	Fluka (Deisenhofen)
Ethanol	VWR (Darmstadt)
Histon Acetyltransferase Inhibitor II	Calbiochem (Bad Soden)
Isopropanol	VWR (Darmstadt)
<i>Page Ruler DNA Ladder-Mix</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
Methanol	Fischer Scientific (Schwerte)
<i>Pierce ECL Western Blot Substrate</i>	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
Ponceau S	Serva (Heidelberg)
Protein A-Agarose	Roche (Mannheim)
<i>Protease Inhibitor Cocktail</i>	Calbiochem (Bad Soden)
<i>Protein Ladder-Mix</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
Trichostatin A	Calbiochem (Bad Soden)

3.2.2. Enzyme

Enzyme	Bezugsquelle
Hyaluronidase	Sigma (Taufkirchen)
Restriktionsenzyme	Fermentas (St. Leon-Rot)

3.2.3. Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
α - alpha Tubulin (GR12077-1)	Abcam (Cambridge)
α - alpha Tubulin acetyliert (T9026)	Sigma (Taufkirchen)
α - Aktin (ab1801)	Abcam (Cambridge)
α - Flag M2 (200472)	Stratagene (Waldbronn)
α - H3 (ab1791)	Abcam (Cambridge)
α - H3K9ac (ab61231)	Abcam (Cambridge)
α - H3K18ac (ab61233)	Abcam (Cambridge)
α - Hdac1 (05-100)	Millipore (Schwalbach)
α - Hdac4 (H-92) (sc-11418)	Santa Cruz (California)
α - Hdac6 (H-300) (sc-11420)	Santa Cruz (California)
α - Hsp90 (beta/Hsp84 Ab-1) (RB-118-P)	Thermo Scientific (Waltham)
α - Lamin A (ab26300)	Abcam (Cambridge)
α - mouse HRP (sc-2005)	Santa Cruz (California)

α - Rabbit HRP (P0217)	Dako (Hamburg)
α - RhoA (26C4) (sc-418)	Santa Cruz (Californien)
α - Trps1 (Wuelling 2009)	Eurogentec (Seraing)

3.2.4. Verbrauchsmaterialien und Sonstiges

Verbrauchsmaterialien und Sonstiges	Bezugsquelle
Deckgläser	Roth (Karlsruhe)
dNTPs (100 mM)	VWR (Darmstadt)
Elektroporationsküvetten (1 mm)	Bio-Rad (München)
Elektroporationsküvetten (Zellkultur)	Lonza (Köln)
Nadel 25 G	Terumo (Leuven)
Nadel 27 G	Braun (Melsungen)
Nitrocellulose-Filterpapier (0,8 μ m)	Millipore (Schwalbach)
Nitrocellulose-Membran	Bio-Rad (München)
Objektträger (SuperfrostPlus)	Roth (Karlsruhe)
Paraplast-Paraffin	Roth (Karlsruhe)
Röntgenfilme	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
Whatman Papier	Macherey-Nagel (Düren)

3.2.5. Kits

Kits	Bezugsquelle
<i>Cell Line Nucleofector Kit T</i>	Lonza (Köln)
<i>FastPlasmid Mini</i>	Eppendorf (Hamburg)
<i>FITC BrdU Flow Kit</i>	BD Bioscience (Franklin Lakes)
Hdac Aktivitätstest	Calbiochem (Bad Soden)
QIAGEN Plasmid Midi	Qiagen (Hilden)
Roche HD Transfektionsreagenz	Roche (Mannheim)
<i>jet Prime</i> DNA Transfektionsreagenz	Polyplus-Transfection (Illkirch Cedex)
<i>Vectastain Elite ABC Kit</i>	Vector Laboratories (Burlingame)
<i>Vybrant DyeCycle Green</i>	Invitrogen (Karlsruhe)

3.2.6. Geräte und Software

Geräte	Hersteller
Äkta FPLC System	GE Healthcare (Solingen)
Biophotometer	Eppendorf (Hamburg)
Brutschrank (Bakterien)	Memmert (Schwabach)

Einbettstation	Leica (Wetzlar)
Elektrophoresekammern (horizontal)	Peqlab (Erlangen), Serva (Heidelberg)
Elektrophoresekammern (vertikal)	bsb11 (Nottuln), Hoefer (Holliston)
Elektroporationsgerät (Gene Pulser)	Bio-Rad (München)
ELISA-Reader (Genios Pro)	Tecan (Männedorf)
Entwicklermaschine für Filme (Curix 60)	AGFA (Leverkusen)
Feinwaage	Mettler Toledo AL 54 (Gießen)
Gel-Dokumentationsanlage	INTAS (Göttingen)
Gewebeeinbettautomat	Microm (Walldorf)
Kamera <i>Fusion</i> FX7 (Westernblot)	Peqlab (Erlangen)
Kamera Spot 23.0	Diagnostik Instruments (Sterling Heights)
Mikroliterpipetten	Eppendorf (Hamburg)
Mikroskop: Axioplan 2, Axiovert 200	Zeiss (Göttingen)
Mikrotom	Microm (Walldorf)
MikroWelle	Sharp (Hamburg)
MilliQ-Anlage	Millipore (Schwalbach)
Nanodrop	Peqlab (Erlangen)
Nucleofector	Lonza (Köln)
PCR-Geräte (Mastercycler epgradientS)	Eppendorf (Hamburg)
PCR-Geräte (Thermocycler T3000)	Biometra (Göttingen)
pH-Meter	Mettler Toledo (Gießen)
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Schüttelinkubator	HT Infors (Einsbach)
Stereomikroskop (MZ FLIII)	Leica (Wetzlar)
Sterilbank (HERAsafe, MSC-Advantage)	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
Sterilbank	BDK (Sonnenbühl-Genkingen)
Thermobad	GFL (Burgwedel)
Thermomixer	Eppendorf (Hamburg)
Thermo-Magnet-Rührer	IKA (Staufen)
Vortex	Scientific Industries (New York)
Waage	Mettler Toledo PL 3002 (Gießen)
Westernblot-Transfertank	Peqlab (Erlangen), Hoefer (Holliston)
Zellkultur-Inkubatoren	Labotect (Göttingen)
Zentrifugen: 5810R (Rotor F45-30-11 für Eppendorf-Gefäße, Rotor A-4-62 für Falcon-Gefäße), 5417C, 5415D	Eppendorf (Hamburg)

Software	Gerät
Fusion	Fusion FX7 Kamera
INTAS GDS	Gel-Dokumentation
<i>ImageJ</i>	Pixelanalyse
Magellan	ELISA-Reader
<i>Spot Advanced</i> Version 4.5.7	Mikroskope

3.2.7. Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
Alzian Blau Färbelösung	1% (w/v) Alzian Blau 8GX 0,1 N HCL, pH 1
10x Anodenpuffer	2 M Tris/HCL, pH 8,9
Fraktionierungspuffer	250 mM Saccharose 20 mM HEPES, pH 7,4 10 mM KCl 1,5 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 mM DTT 1% (v/v) Protease Inhibitor Cocktail
Hyaluronidasepuffer	100 mM Na ₂ HPO ₄ 100 mM NaCH ₃ CO ₂ pH 5,0
10x Kathodenpuffer	1 M Tris/HCL 1 M Tricin 1% (w/v) SDS
IP-Puffer	20 mM Tris/HCL, pH 7,6 100 mM NaCl 0,2 mM EDTA 0,1% (v/v) NP40 1 mM DTT 1% (v/v) Protease Inhibitor Cocktail
Nukleärer Lysepuffer	Fraktionierungspuffer

	10% (v/v) Glycerin 0,1% (w/v) SDS
6x Orange G-Auftragungspuffer	300 ml/l Glycerin 2 g/l Orange G
10x PBS	1,37 M NaCl 26,8 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ 17 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBT	1x PBS mit 0,1% (v/v) Tween 20
PFA	4% (w/v) in 1x PBS
SDS-PAGE Entfärbelösung	10% (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Essigsäure
SDS-PAGE Färbelösung	50% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure 0,2% (w/v) Comassi Brilliant Blue R250 Lösung durch 0,45 µm Filter filtriert
6x SDS-PAGE Ladepuffer	100 mM Tris/HCl, pH 6,8 20 mM β-Mercaptoethanol 15 mM EDTA 6% (w/v) SDS 60% (v/v) Glycerin 0,2% (w/v) Bromphenolblau
SDS-PAGE Trenngel (x%)	x% (v/v) Acrylamid 400 mM Tris/HCL, pH 8,8 0,1% (w/v) SDS 0,1% (w/v) APS 1:1000 TEMED
SDS-PAGE Sammelgel (5%)	5% (v/v) Acrylamid 125 mM Tris/HCL, pH 6,8 0,1% (w/v) SDS 0,1% (w/v) APS 1:1000 TEMED

1x TAE	40 mM Tris-Base 10 mM EDTA pH 8,0 (Essigsäure)
20x TBS	3 M NaCl 1 M Tris, pH 7,4
1x TBST	1x TBS mit 1% (v/v) Tween 20
TE	10 mM Tris, pH 8,0 1 mM EDTA
Transferpuffer	50 mM Borsäure, pH 8,5 10% Methanol

3.2.8. Nährmedien für Bakterien

Escherichia coli (*E.coli*) Bakterien wurden in Luria Bertani-(LB)-Medium oder auf LB-Agar Platten kultiviert. Die Medien wurden autoklaviert und nach Abkühlung auf etwa 65 °C mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt. Zur Selektion der Bakterien wurde dem LB-Medium oder dem LB-Agar entweder Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) zugesetzt.

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt 1% (w/v) NaCl pH 7,0
LB-Agar	1,5% (w/v) Agar in LB-Medium
SOC-Medium	Lösung A: 2,0% (w/v) Casein 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCL autoklaviert Lösung B: 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄

20 mM Glucose

sterilfiltriert

Lösungen A und B wurden vermischt, mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und zusammen sterilfiltriert

3.2.9. Zellkultur Medien

ATDC5 und HEK293 EBNA Zellen wurden in folgenden Medien kultiviert, differenziert und eingefroren. DMEM/F12, DMEM hoch Glukose, Penicillin/Streptomycin (P/S), PBS (Zellkultur) und Insulin-Transferrin-Selenium-A (ITS) wurden von Invitrogen (Karlsruhe), Fötales Kälber Serum (FCS) von PAN-Biotech (Aidenbach) bezogen.

Medium	Zusammensetzung
ATDC5 Einfriermedium	DMEM/F12 20% FCS 10% DMSO 1% P/S
ATDC5 Kultivierungsmedium	DMEM/F12 5% FCS 1% P/S
ATDC5 Differenzierungsmedium	DMEM/F12 1% ITS 1% P/S
HEK293 EBNA Einfriermedium	DMEM hoch Glukose 20% FCS 10% DMSO 1% P/S
HEK293 Kultivierungsmedium	DMEM hoch Glukose 10% FCS 1% P/S

3.2.10. Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> , <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>phoA supE44</i> <i>thi-1 gyrA96 relA1 λ</i> ⁻	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>E. coli</i> Top 10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)</i> 7697 <i>galU</i> <i>galk rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe)

3.2.11. Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
ATDC5	Murine chondrogene Zelllinie	(Atsumi et al., 1990)
HEK293 EBNA	Humane embryonale Nierenzelllinie	Invitrogen (Karlsruhe)

3.2.12. Mausstämmе

Stamm	Genotyp	Referenz
NMRI	Wildtyp	Harlan-Winkelmann (Borchen)
Trps1 ^{-/-}	Trps1 Defizienz durch eine <i>inframe</i> Deletion des Trps1 GATA Zinkfingers	(Malik et al., 2002)

3.2.13. siRNA Oligonukleotide

siRNAs gegen Hdac2, 4 und 6 und die zu diesem siRNA System gehörende unspezifische siRNA wurden von Dharmacon bezogen. Die Hdac1 siRNA und dazugehörige unspezifische siRNA wurden von Krackeler Scientific bezogen und sind vom Mission esiRNA System. Die Sequenz dieser beiden siRNAs kann nicht angegeben werden, da es sich um mehrere Sequenzen handelt, die gegen die Hdac1 cDNA Sequenz designt sind.

Name	Sequenz (5'-3')	Bezugsquelle
Hdac1 siRNA	nicht bekannt	Krackeler Scientific (Albany)
unsp. siRNA1	nicht bekannt	Krackeler Scientific (Albany)

Hdac2 siRNA	GCCUCAUAGAAUCCGCAUGdTdT	Dharmacon (Chicago)
Hdac4 siRNA	CGACAGGCCUCGUGUGUAUGAUU	Dharmacon (Chicago)
Hdac6 siRNA	GCUCGGCCAAGCAAUGGAAdTdT	Dharmacon (Chicago)
unsp. siRNA2	On-Target plus (Sequenz nicht bekannt)	Dharmacon (Chicago)

3.2.14. Expressionsplasmide

Überexpressionen in ATDC5 und HEK293 EBNA Zellen wurden mit den unten aufgelisteten Plasmide durchgeführt. Die Basis für diese Plasmide war der pFlag-N3 Vektor. Dieser Vektor wurde durch einen Austausch der EGFP Sequenz für das Flag-Peptid (ATGGACTACAAAGACGATGACGATAAATAG) aus dem pEGFP-N3 Vektor (siehe 9.2 im Anhang) hergestellt.

Name	Eigenschaft	Referenz
pFlag-Hdac4	cDNA für humanes <i>Hdac4</i> , C-terminaler Flag-Tag, im pFLAG-N3	Dr. Frank Kaiser, Lübeck
pFlag-Trps1	cDNA für humanes <i>Trps1</i> , C-terminaler Flag-Tag, im pFLAG-N3	Dr. Frank Kaiser, Lübeck
Trps1-F5-Flag	cDNA für znf 4-9 des humanes <i>Trps1</i> , C-terminaler Flag-Tag, im pFLAG-N3	Dr. Frank Kaiser, Lübeck
Trps1-F6-Flag	cDNA für znf 4-7 des humanes <i>Trps1</i> , C-terminaler Flag-Tag, im pFLAG-N3	Dr. Frank Kaiser, Lübeck
Trps1-F10-Flag	cDNA für znf 4-6 des humanes <i>Trps1</i> , C-terminaler Flag-Tag, im pFLAG-N3	Dr. Frank Kaiser, Lübeck

3.3. Methoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden in einem S1-Zellkulturlabor mit Umluftstrom-Sterilbank durchgeführt. Versuche mit genetisch veränderten Organismen wurden im S1-Labor durchgeführt. Die folgenden beschriebenen Methoden und Arbeitstechniken basieren auf Protokollen des Instituts für Entwicklungsbiologie.

3.3.1. Mikrobiologische Methoden

3.3.1.1. Nährmedien

Für die mikrobiologischen Arbeiten wurden die *E.coli* Stämme TOP10 und DH5 α verwendet. Beide Stämme wurden in LB Medium angezogen.

3.3.1.2. Herstellung elektrokompeter *E. coli* Zellen

Eine Übernacht-Kultur wurde 1:50 in LB-Medium verdünnt, bei 37 °C bis zu einer OD₅₇₈ von etwa 0,6 wachsen gelassen und anschließend für 15 Minuten auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden mittels Zentrifugation bei 5.000 x g und 4 °C für 5 Minuten geerntet, im gleichen Volumen eiskaltem H₂O resuspendiert und erneut bei 5.000 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Die Bakterienpräzipitate wurden mit 0,5 Volumen eiskaltem H₂O resuspendiert, bei 5.000 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert und in 1/50 Volumen eiskaltem sterilen 20%igem Glyzerol wieder aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 5.000 x g und 4 °C für 5 Minuten wurden die Bakterien in 1/500 Volumen eiskaltem sterilen 20%igem Glyzerol resuspendiert, in 50 μ l Aliquots aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.3.2. Molekularbiologische Methoden

3.3.2.1. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA Proben wurde mittels eines *Nano-Drop* (Peglab) bestimmt. Die Technik basiert auf einer spektralphotometrischen Messung bei einer Wellenlänge von

260 nm. Dabei entspricht eine Extinktion von 1,0 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

3.3.2.2. Lagerung von DNA

DNA gelöst in z. B. TE-Puffer kann über eine unbestimmte Zeit bei -20 °C gelagert werden.

3.3.2.3. Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Um Gemische von DNA-Fragmenten oder linarisierte Plasmide nach dem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde die Methode der Agarose-Gelelektrophorese verwendet. DNA-Fragmente sollten eine Größe von mehr als 100 Basenpaaren aufweisen, um in einem Agarosegel getrennt zu werden. Dabei können je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente Agarosekonzentrationen von 0,5% - 2,5% verwendet werden. Hergestellt wurden Agarosegele, indem eine Agarosesuspension der gewünschten Konzentration in einer Mikrowelle aufgekocht, auf 60 °C abgekühlt, mit Ethidiumbromid (0,1 µg/ml Endkonzentration) versetzt, umgerührt und in die vorgesehene Horizontal-Gelapparatur gegossen wurde. Die Agarosesuspension wurde durch Anrühren von Agarosepulver in TAE-Puffer hergestellt. Die mit Ladepuffer versetzten DNA-Fragmente wurden auf das Gel aufgetragen und bei einer Elektrophoresespannung von 10 V/cm bei analytischen und 7,5 V/cm bei präparativen Agarosegelen dem Molekulargewicht nach getrennt.

3.3.2.4. Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Um nach einer Plasmidpräparation feststellen zu können, ob das richtige Plasmid präpariert wurde oder um für Klonierungsexperimente die jeweiligen Fragmente zu erhalten, wurden Restriktionsverdauungen durchgeführt. Typ II Restriktionsendonukleasen erkennen spezifisch eine definierte DNA-Sequenz von 4 bis 8 Basenpaaren (meistens 6) und schneiden den DNA-Doppelstrang in den meisten Fällen spezifisch in dieser Sequenz. Dabei entstehen entweder Einzelstrangüberhänge (*sticky-ends*) oder ein glatter Doppelstrang (*blunt-end*). Restriktionen wurden durchgeführt, indem die zu schneidende DNA zusammen mit dem Enzym, in einem für das jeweilige Enzym geeigneten Puffer bei einer für das Enzym optimalen Temperatur (meistens 37 °C) für 1 - 12 Stunden inkubiert wurde (nach Herstellerangaben). Wurden Fast Digest Enzyme der Firma Fermentas verwendet, wurde der Restriktionsansatz 5 – 30

Minuten inkubiert. In der Regel wurden Restriktionen mit 2 U Enzym pro μg DNA durchgeführt. Die Restriktionsspaltung wurde anschließend auf einem analytischen Agarosegel auf eine vollständige und korrekte Spaltung überprüft.

3.3.2.5. Plasmid-Präparation

Um Plasmide für Klonierungen verwenden oder bereits klonierte Plasmide analysieren bzw. charakterisieren zu können, müssen sie in ausreichender Menge vorhanden sein. Dazu wurde für eine Präparation im kleinen Maßstab das Eppendorf „*FastPlasmid Mini*“ Kit und für eine Präparation im großen Maßstab das QIAGEN „*Plasmid Midi*“ Kit verwendet. Alle Präparationen wurden nach den originalen Manuals der jeweiligen Kits durchgeführt.

3.3.2.6. Transformation von Bakterien mit Plasmiden

Als Klonierungs- und Anzuchtsstämme für Plasmide wurde zum einen der *E. coli* TOP10 Stamm verwendet, der chemisch kompetent von Invitrogen geliefert wird, und zum anderen der elektrokompenten *E. coli* DH5 α Stamm.

3.3.2.6.1. Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Ein Aliquot ($\sim 50 \mu\text{l}$) chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Es wurden 0,5 - 3 μl Plasmid (0,5 μl bei einem präparierten Plasmid und bis zu 3 μl bei Verwendung eines Ligationsansatzes) zu den Zellen pipettiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitze-Schock, bei dem der Transformationsansatz für 30 Sekunden in ein 42 °C warmes Wasserbad gehalten wurde. Nach 2 Minuten auf Eis wurden 250 μl , auf 37 °C vorgewärmtes, SOC-Medium zum Ansatz pipettiert und für 60 Minuten im Thermomixer bei 37 °C bei 350 Upm geschüttelt. 200 μl dieser Transformation wurden auf eine Selektionsplatte ausgestrichen.

3.3.2.7. Transformation elektrokompenter Bakterien

Ein Aliquot ($\sim 50 \mu\text{l}$) elektrokompenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut. Es wurden 0,5 - 3 μl Plasmid (0,5 μl bei einem präparierten Plasmid und bis zu 3 μl bei Verwendung eines

Ligationsansatzes) zu den Zellen pipettiert. Der Transformationsansatz wurde in eine 1 cm Elektroporationsküvette überführt und bei 2,5 KV elektroporiert. In die Küvette wurden sofort 950 µl, auf 37 °C vorgewärmtes, SOC-Medium pipettiert und der Ansatz in einem 1 ml Eppendorf Reaktionsgefäß für 1 Stunde bei 37 °C im Thermomixer bei 350 Upm geschüttelt. Nach dieser Stunde wurde der Transformationsansatz bei 100 x g für 1 Minute in einer Tischzentrifuge herunterzentrifugiert, in 200 µl LB-Medium aufgenommen und 50 - 200 µl auf einer Selektionsplatte ausplattiert.

3.3.3. Histologie

3.3.3.1. Einbettung der Vordergliedmaßen der Maus in Paraffin

Die Vordergliedmaßen der Maus wurden nach der Präparation über Nacht bei 4 °C schwenkend in 4% PFA fixiert. Anschließend wurden die Extremitäten im Gewebereinbettautomaten dehydriert und mit Paraffin durchtränkt. Dieses geschah nach dem in Tabelle 3-1 stehenden Programm. Anschließend wurden die Extremitäten in flüssigem Paraffin auf einer Kühlplatte ausgerichtet und in Blöcken eingebettet. Die eingebetteten Gliedmaßen wurden bei 4 °C gelagert.

Tabelle 3-1: Programme zum Einbetten von Extremitäten.

	Zeit
70% Ethanol	10 min
80% Ethanol	10 min
95% Ethanol	10 min
100% Ethanol	10 min
100% Ethanol	10 min
100% Ethanol	10 min
Xylol	20 min
Xylol	30 min
Paraffin	1 h
Paraffin	1 h
Paraffin	1 h

3.3.3.2. Anfertigung von Schnitten der Gliedmaßen

Es wurden 5 µm Gliedmaßenschnitte am Mikrotom angefertigt. Diese wurden in ein auf 37 °C erwärmtes, mit 10%igem Ethanol gefülltes Bad gelegt, damit sich die Schnitte ausbreiten können. Anschließend wurden diese auf Objektträger gezogen und auf einer 60 °C Heizplatte fixiert. Die Objektträger wurden bei 4 °C gelagert.

3.3.3.3. Immunhistochemische Antikörperfärbung

Zuerst wurden die Gliedmaßenschnitte durch die in Tabelle 3-2 angegebene Arbeitsschritte deparaffinisiert. Danach fand eine Inaktivierung der endogenen Peroxidasen statt, indem die Schnitte 5 min in 3%ige H₂O₂ Lösung in PBS bei Raumtemperatur getaucht wurden. Nach Waschschritten in PBS, PBST und Hyaluronidase-Puffer für 5 min wurde das Knorpelgewebe mittels eines Hyaluronidaseverdaus (500 U/ml, 30 min bei 37 °C) für die Antikörper zugänglich gemacht. Nach 2-maligem Waschen in PBST für 5 min wurden die Schnitte 1h in 10%igem Lämmerserum in PBS geblockt, anschließend erneut 5 min in PBST gewaschen und über Nacht mit dem, in 5%igem Lämmerserum verdünnten (1:50-1:200), Antikörper bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 3-mal für 5 min in PBST gewaschen und für 1h mit dem biotinylierte Sekundärantikörper (aus dem *Vectastain Elite ABC Kit*), verdünnt in 5%igem Lämmerserum in PBS (1:200), bei 4 °C inkubiert. Nach 3-maligem waschen für 5 min mit PBST wurden die Schnitte mittels des *Vectastain Elite ABC Kits* genau nach Anleitung gefärbt, eingedeckelt und unter dem Mikroskop ausgewertet.

Tabelle 3-2: Deparaffinisierungs-Arbeitsschritte.

	Zeit
60 °C	30 min
Xylol	5 min
Xylol	10 min
100% Ethanol	3 min
95% Ethanol	3 min
75% Ethanol	3 min
50% Ethanol	3min
30% Ethanol	3 min
PBS	3 min
PBS	3 min

3.3.4. Zellkultur

3.3.4.1. Einfrieren von Zelllinien

In Kultur gehaltene Zellen wurden mit einer 0,5%igen Trypsin/EDTA Lösung vom Schalenboden gelöst, die Zellzahl mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt und mit Einfriermedium auf eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml eingestellt. In einem Cryoröhrchen wurden je 1 ml dieser Zellsuspension in einer Styroporbox langsam über Nacht auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Nach Überführung in eine $-146\text{ }^{\circ}\text{C}$ Gefriertruhe konnten die Zellen für mehrere Monate gelagert werden.

3.3.4.2. Auftauen von Zelllinien

Ein Cryoröhrchen mit 10^6 Zellen/ml wurde direkt aus der $-146\text{ }^{\circ}\text{C}$ Gefriertruhe in ein $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmes Wasserbad überführt und dadurch schnell aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden mit 10 ml Medium verdünnt und in einem 15 ml Falcon Reaktionsgefäß bei $200 \times g$ für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpräzipitat wurde in 12 ml Medium resuspendiert und in einer T75 Zellkulturflasche für 2 Tage ohne weiteres Passagieren im Begasungsbrutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ belassen.

3.3.4.3. Kultivierung von Zelllinien

Die ATDC5 und HEK293 EBNA Zelllinien wurden in T75 und T175 Zellkulturflaschen im Begasungsbrutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 kultiviert. Um die Zellen immer in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten, wurden die Zellkulturen mittels Verdünnen und Passagieren in neue Zellkulturgefäße überführt. Eine konfluente Zelllinie wurde 1:10 bis 1:20 verdünnt. Zum Ablösen der adhären Zellen wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen, danach mit 0,5%igem Trypsin/EDTA für 5 Minuten überschichtet, nach Ablösen der Zellen wurde das Trypsin mit serumhaltigem Medium inaktiviert und mit dem gewünschten Faktor verdünnt. Die verdünnte Zellsuspension wurde in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät. ATDC5 Zellen wurden in DMEM/F12 mit 5% FCS (Fötales Kälber Serum) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S), HEK293 EBNA Zellen in DMEM hoch Glukose mit 10% FCS und 1% P/S kultiviert.

3.3.4.4. DNA Transfer in Zelllinien

ATDC5 Zellen lassen sich nur schwer mit DNA transfizieren. Deshalb wurden Expressionsplasmide mittels der Lonza *Nucleofector* Methode transfiziert. In HEK293 EBNA Zellen lässt sich DNA recht gut transfizieren. Somit wurden HEK293 EBNA Zellen mittels des Roche HD Transfektionsreagenzes mit Expressionsplasmiden transfiziert. siRNA Transfektionen geschahen in HEK293 EBNA Zellen mittels des *jet Prime* DNA Transfektionsreagenzes.

3.3.4.4.1. DNA Transfer in ATDC5 Zellen

Alle Expressionsplasmide wurden unter Verwendung des *Cell Line Nucleofector* Kit T von Lonza in die ATDC5 Zelllinie transfiziert. Die adhärenenten Zellen einer zu 80% konfluenten T75 Zellkulturflasche wurden mit 10 ml PBS gewaschen, bevor 5 ml Trypsin/EDTA Lösung zugegeben wurde, um die Zellen vom Gefäßgrund zu lösen. Die Trypsin/EDTA Lösung wurde für 5 Minuten bei 37 °C im Begasungsbrutschrank auf den Zellen belassen. Nach Ablösen der Zellen wurden sie in 5 ml Medium verdünnt und die Zellzahl bestimmt. Von dieser Suspension wurden 1×10^6 Zellen in ein 15 ml Falcon Reaktionsgefäß überführt und für 10 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpräzipitat in 50 µl *Nucleofector T Solution* mittels Schwänken und leichtem Klopfen resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden 2 µg Plasmid-DNA pipettiert, der Ansatz leicht umgerührt und in eine Lonza Küvette überführt. Die Zellen wurden dann im Lonza *Nucleofector* mit dem Programm T-020 elektroporiert, so dass die liposomenumhüllte Plasmid-DNA von den Zellen aufgenommen werden konnte. Direkt nach Beendigung des Programms wurden die transfizierten Zellen in ein Falcon Reaktionsgefäß mit 37 °C vorgewärmtem Medium überführt, wobei eine Lonza Plastikpipette verwendet wurde. Dieses Falcon Reaktionsgefäß wurde unter Schwenken leicht gemischt und bei 200 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpräzipitat in 1,5 ml Medium resuspendiert. 1 ml bzw. 0,5 ml dieser Suspension wurden in ein *Well* einer 6-*Well*-Platte, mit auf 37 °C vorgewärmtem Medium, pipettiert. Die transfizierten Zellen wurden für mindesten 24 Stunden im Begasungsbrutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ zur Expression gelassen und nach der Zelllyse weiter analysiert.

3.3.4.4.2. DNA Transfer in HEK293 EBNA Zellen

Sollten Expressionsplasmide in HEK293 EBNA Zellen transfiziert werden, wurde dieses mittels des Roche HD Transfektionsreagenzes genau nach Anleitung durchgeführt. Die Zellen wurden in ein *Well* einer 6-*Well*-Platte gesät, bis zu einer Konfluenz von 80 % wachsen gelassen und mit 2 µg Plasmid-DNA transfiziert. Nach mindestens 24 h im Begasungsbrutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ zur Expression, wurden die Zellen lysiert und analysiert.

Wurden siRNAs transfiziert, wurde dieses nach der Anleitung des *jet Prime* DNA Transfektionsreagenzes durchgeführt. Die Zellen wurden in ein *Well* einer 6-*Well*-Platte gesät, bis zu einer Konfluenz von 40 % wachsen gelassen und mit der siRNA transfiziert. Nach mindestens 48 h im Begasungsbrutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ wurden die Zellen lysiert und analysiert.

3.3.4.5. Zelllyse

Die Zellen wurden vorsichtig mit eiskaltem PBS (Zellkultur) überschichtet und mittels leichtem Schwenken gewaschen. Das PBS wurde abgenommen und die Zellen in eiskaltem IP-Puffer mittels eines Zellschabers vom Zellkulturgefäß abgelöst. Die Zellsuspension wurde 10-mal durch eine G25 Nadel trituriert und anschließend bei 5000 x g für eine Minute zentrifugiert, um DNA und Zellmembranen mit dem Pellet zu entfernen. Der Überstand enthielt das zu analysierende Proteom.

3.3.4.6. Zellfraktionierung

Zu fraktionierende Zellen wurden einmal mit eiskaltem PBS (Zellkultur) vorsichtig schwenkend gewaschen. Das PBS wurde abgenommen und die Zellen in Fraktionierungspuffer vom Zellkulturgefäß mit einem Zellschaber gelöst. Um die Zellmembranen mechanisch aufzuschließen, wurde die Suspension 3-mal in flüssigem Stickstoff gefroren, wieder aufgetaut, dann 15-mal durch eine 25 G und 20-mal durch eine 27 G Nadel unter Zuhilfenahme einer Spritze trituriert. Anschließend wurde das Lysat bei 680 x g für 10 min zentrifugiert, um die Zellkerne vom restlichen Lysat zu trennen. Die Zellkernfraktion wurde 1-mal in Fraktionierungspuffer gewaschen und mit nukleärem Lysepuffer aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde bei 10000 x g für 15 min zentrifugiert. Der

Überstand enthält die Zytoplasma/Membranfraktion. Das Pellet enthielt die Mitochondrienfraktion und wurde verworfen. Die Zellkern- und Zytoplasma/Membranfraktion wurde bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

3.3.4.7. ATDC5 Differenzierung

ATDC5 Zellen wurden durch die Zugabe von 1% ITS (Insulin Transferrin Selenium), mit gleichzeitiger FCS-Reduktion (Differenzierungsmedium), von einer mesenchymalen Vorläuferzelllinie in Chondrozyten differenziert. Diese Differenzierung läuft über einen Zeitraum von 28 Tagen, wobei das Differenzierungsmedium alle 2 Tage gewechselt wird. Die Differenzierung ist in der Formation von so genannten *Nodules* zu erkennen.

3.3.4.8. Alzian Blau Färbung der ATDC5 Nodules

Die differenzierten ATDC5 Zellen wurden 1-mal in eiskaltem PBS gewaschen und für 20 Minuten in 100%igem Ethanol bei -20 °C fixiert. Anschließend wurden sie mit 0,1 N HCL gewaschen und über Nacht mit Alzian Blau Färbelösung gefärbt. Es folgte 2-maliges Waschen mit H₂O.

3.3.5. Proteinbiochemische Methoden

3.3.5.1. Co-Immunpräzipitation

Konfluente Zellen aus einem *Well* einer 6-*Well*-Platte wurden in 500 µl IP-Puffer lysiert. 100 µl Protein A-Agarose wurden 5-mal in 500 µl IP-Puffer, im Wechsel mit Zentrifugationen bei 800 x g für 2 Minuten, gewaschen und somit äquilibriert. Die Protein A-Agarose wurde in 100 µl IP-Puffer resuspendiert. Um unspezifische, an die Protein A-Agarose bindende, Proteine aus dem Zelllysate zu entfernen, wurden 25 µl Protein A-Agarose dem Lysat zugesetzt und für 45 Minuten rotierend bei 4 °C inkubiert. Die Agarose wurde sedimentiert (800 x g für 2 min), der Überstand abgenommen und mit 2,5 µg Antikörper versetzt und über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Anschließend wurden 75 µl Protein A-Agarose hinzugefügt und für 120 Minuten bei 4 °C rotierend inkubiert, so dass sich Protein-Antikörper-Protein A-Agarose-Komplexe bilden konnten. Die Agarose wurde sedimentiert

(800 x g für 2 min) und 5-mal in IP-Puffer gewaschen. Um die Proteinkomplexe von der Protein-A-Agarose zu lösen, wurde die Agarose in 1x SDS-PAGE Ladepuffer resuspendiert auf 99 °C aufgeköcht und die Agarose sedimentiert (5000 x g für 20 sek). Die Proteinkomplexe im Überstand wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

3.3.5.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Analyse von Zelllysaten, Co-IPs und anderen Proteinproben wurden PAGEs in 8 bis 12%igen SDS-Polyacrylamid-Trenngelen mit 6%igem Sammelgel nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Dazu wurden 30 µl der Proteinproben mit 6 µl 6 x SDS-PAGE Ladepuffer versetzt, 3 Minuten bei 99 °C gekocht und auf das Gel aufgetragen. Die Gele wurden in 1x Anoden und Kathodenpuffer zuerst bei 8 V/cm Gel bis zum Erreichen des Trenngels und dann bei 15 V/cm Gel bis kurz vor Ende des Trenngels laufen gelassen.

Sollten die Proteine im Gel angefärbt werden, wurden die Gele für 30 Minuten bei etwa 60 °C in SDS-PAGE Färbelösung gefärbt und in SDS-PAGE Entfärbelösung entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Ansonsten wurden die Proteine zur weiteren Analyse auf eine Nitrocellulosemembran geblottet.

3.3.5.3. Westernblot

Nachdem die Proteine mittels SDS-PAGE separiert wurden, wurden sie über Nacht in einer Tank-Blot-Apparatur bei 12 V im Transfer-Puffer auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Wurden Aktin, Flag, H3, Hdac4, Hdac6, Lamin A, RhoA oder alpha Tubulin Antikörper verwendet, wurde die Membran in 5 % Milchpulverlösung geblockt. Bei Verwendung der Hdac1, Trps1, H3K9ac, H3K18ac oder acetyliertes alpha Tubulin Antikörper, wurde die Membran in 1 % BSA geblockt. Die Antikörper wurden in der jeweiligen Blockinglösung verdünnt [α -Actin (1:1000), α -Hdac1 (1:200), α -Hdac 4 (1:500), α -Hdac6 (1:500), Lamin A (1:1000), RhoA (1:500), α -Trps 1 (1:1000), α -alpha Tubulin (1:10000), α -acetyliertes alpha Tubulin (1:2000), α -Flag (1:5000), α -H3K9ac (1:2000), α -H3K18ac (1:2000), α -H3 (1:10000)] und für 2,5 h bei Raumtemperatur auf der Membran schwenkend inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3-mal für 5 Minuten in TBST gewaschen und HRP-gekoppelte Sekundärantikörper (α - Rabbit HRP 1:12000 in 1% BSA; α - mouse HRP 1:10000 in TBST) für 1h bei Raumtemperatur schwenkend hybridisiert. Danach wurde die Membran

1-mal in TBST und 2-mal in TBS für 5 Minuten gewaschen, in Pierce ECL Westernblot Substrat gedippt und in der Dunkelkammer Röntgenfilme belichtet.

3.3.5.4. Hdac Aktivitätstest

5 µg Zelllysate oder Proteinextrakt aus Vordergliedmaßen wurden zur Hdac Aktivitätsmessung eingesetzt. Der Aktivitätstest wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt, wobei die Inkubationszeiten 15 Minuten betrugen. Die Fluoreszenz wurde mit dem Genios Pro ELISA Plattenleser gemessen. Pro *Well* wurde der Durchschnitt aus 3x3 Messungen errechnet.

3.3.5.5. Gelfiltration

Um zu testen ob Trps1 in größeren Proteinkomplexen in Zellen vorliegt, wurde die Methode der Gelfiltration durchgeführt. Mittels einer Gelfiltrationssäule können Proteine und Proteinkomplexe aufgrund ihrer Größe separiert werden. Dabei eluieren große Proteine und Komplexe vor kleinen.

Es wurde eine Superdex 200 Gelfiltrationssäule gewählt, die Proteine zwischen 10 und 600 kDa separieren kann. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min wurde mittels eines Äkta FPLC Systems zuerst die Säule mit einem Säulenvolumen entgastem IP-Puffer gewaschen, dann das bei 14000 x g abzentrifugierte Zelllysate auf die Säule geladen und ebenfalls mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min im entgasten IP-Puffer über die Säule, bis zur Elution aller Proteine, laufen gelassen und 1ml Fraktionen gesammelt. Anschließend wurde nach erneutem Waschen der Säule, in einem Säulenvolumen IP-Puffer, eine Größenstandard-Proteinlösung, bestehend aus Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Catalase (240 kDa), Aldolase (158 kDa) und α -Amylase (51 kDa), unter gleichen Bedingungen separiert, um das Volumen zu ermitteln, bei dem die jeweilig unterschiedlich großen Proteine eluieren. Graphisch wurde eine Gerade aus dem dekadischen Logarithmus der Standardproteingröße gegen das Elutionsvolumen ermittelt, an der die Protein- bzw. Proteinkomplexgrößen der gesammelten Fraktionen bestimmt werden konnten.

3.3.5.6. Statistik und Auswertungen

Statistische Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, unpaaren t-Test durchgeführt. Anzahl der Experimenten und Bedingungen sind in den Abbildungslegenden angegeben. P-Werte $<0,05$ werden als signifikant bezeichnet. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken in den jeweiligen Abbildungen dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1. Trps1 und Hdac Proteine sind während der Knorpel- und Knochenentwicklung parallel exprimiert

Es ist bekannt, dass Trps1 und Hdac Proteine ähnliche Funktionen in der Chondrozyten Differenzierung und Knochenentwicklung ausführen und vergleichbare Schritte regulieren (Napierala et al., 2005; Napierala et al., 2008; Suemoto et al., 2007; Vega et al., 2004; Wuelling et al., 2009). In dieser Arbeit wurde das Expressionsprofil von Trps1, Hdac4 und Hdac6 auf Schnitten der embryonalen Vorderextremitäten von Wildtyp Mäusen der Stadien E14,5 und E16,5 (embryonale Tage 14,5 und 16,5) und murinen chondrogenen ATDC5 Zellen analysiert, um zu untersuchen, ob diese Proteine Zelltyp-spezifisch während der Knorpel- und Knochenentwicklung parallel exprimiert werden.

4.1.1. Trps1 wird in distalen, proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten exprimiert

Mittels einer immunhistologischen Trps1 Antikörperfärbung wurde die Trps1 Proteinexpression in sich entwickelnden Vorderextremitäten der Maus untersucht. Dafür wurden die Stadien E14,5 und E16,5 verwendet. Es ist deutlich zu erkennen, dass Trps1 in distalen, proliferierenden und in prähypertrophen Chondrozyten exprimiert ist (Abbildung 4-1). Die Negativkontrollen (Abbildung 4-2), bei der nur der 1. Antikörper (a) und der 2. Antikörper (b) verwendet wurde, zeigen, dass die beiden Antikörper keinen Hintergrund in der Färbung verursachen. Das aus der Literatur (Kunath et al., 2002) bekannte mRNA (Boten-RNA) Expressionsprofil konnte somit bestätigt werden.

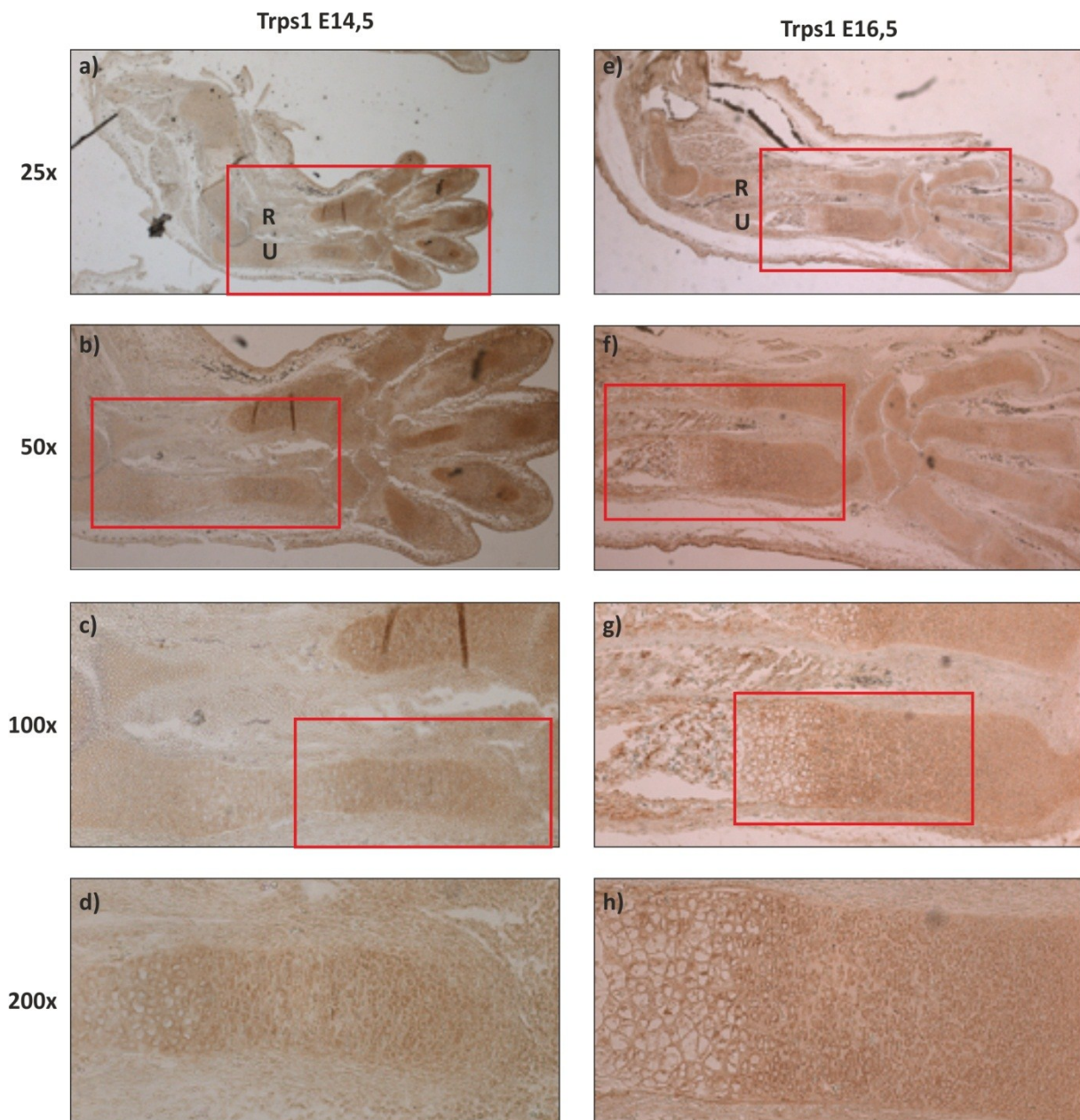


Abbildung 4-1: Trps1 ist in distalen, proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten exprimiert.

Immunohistochemische Trps1 Protein Färbung auf Schnitten der Vorderextremitäten von E14,5 (**a-d**) und E16,5 (**e-h**) Wildtyp Mäusen. Die roten Rechtecke zeigen jeweils den Ausschnitt der nächsten Vergrößerung. (a, e) 25x, (b, f) 50x, (c, g) 100x und (d, h) 200x Vergrößerung. U=Ulna, R=Radius. Trps1 wird in distalen, proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten exprimiert.

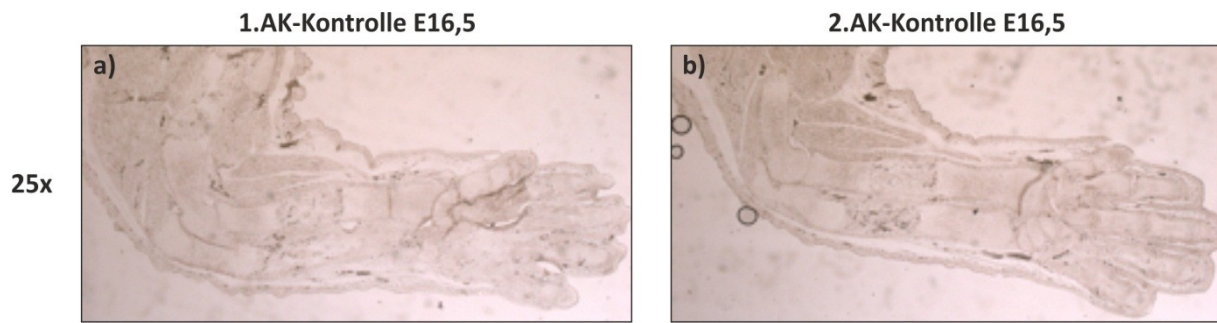


Abbildung 4-2: Die Negativkontrollen der Trps1 Färbung zeigen keine Hintergrundfärbung.

Immunhistochemische Kontrollfärbung auf E16,5 Schnitten der Vorderextremitäten von Wildtyp Mäusen. **(a)** Die Negativkontrolle, bei der nur der 1. Antikörper (Trps1 Antikörper) verwendet wurde, zeigt genauso wie die Negativkontrolle mit dem 2. Antikörper (sekundärer HRP-gekoppelter Antikörper) **(b)** keine Hintergrundfärbung. Vergrößerung: 25x.

4.1.2. Trps1 wird kontinuierlich, aber leicht erhöht während der ATDC5 Differenzierung exprimiert

Die chondrogene murine ATDC5 Zelllinie wird verwendet um Differenzierungsprozesse von Chondrozyten zu analysieren. Durch Zugabe von Insulin Transferrin Selenium (ITS) können diese Zellen über einen Zeitraum von 28 Tagen in Chondrozyten differenziert werden. Während dieser Differenzierung lassen sich dann spezifische regulatorische Prozesse untersuchen. Im Verlauf dieser Arbeit wurden diese Zellen für Analysen der Funktion von Trps1 und Hdac Proteinen verwendet. Im Westernblot (Abbildung 4-3) wurde die Veränderung des Trps1 Proteingehalts über den Zeitraum der Differenzierung (28 Tage) in ATDC5 Zelllysaten analysiert. Trps1 ist während der Differenzierung kontinuierlich sowohl in differenzierenden (+ITS) als auch in nicht differenzierenden (-ITS) ATDC5 Zellen zu allen Zeitpunkten exprimiert. Im Vergleich zu nicht differenzierenden Zellen ist der Trps1 Gehalt in differenzierenden Zellen leicht erhöht. Die Expression von Trps1 scheint somit während der Differenzierung von ATDC5 Zellen hochreguliert zu werden.

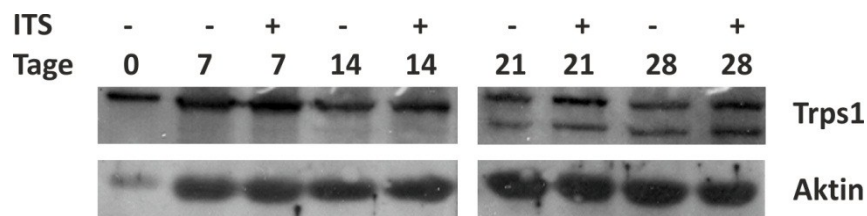


Abbildung 4-3: Trps1 wird leicht erhöht während der ATDC5 Differenzierung exprimiert.

Trps1 und Aktin Westernblot von differenzierenden und nicht differenzierenden ATDC5 Lysaten nach 0, 7, 14, 21 und 28 Tagen. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1% ITS differenziert. Trps1 ist zu allen Zeitpunkten kontinuierlich nachzuweisen und in differenzierenden Zellen leicht erhöht. Der Aktin Westernblot dient als Ladekontrolle.

4.1.3. Hdac4 wird in proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten und in Osteoblasten exprimiert

Eine immunhistologische Hdac4 Antikörperfärbung auf Schnitten der Vorderextremitäten von Wildtyp Mäusen der Stadien E14,5 und E16,5 wurde durchgeführt, um die Expressionsbereiche des Hdac4 Proteins während der enchondralen Ossifikation zu bestimmen. Hdac4 ist zum Zeitpunkt E14,5 der Entwicklung in proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten exprimiert (Abbildung 4-4a-c). Somit sind Trps1 und Hdac4 in diesen Zellen parallel exprimiert und potentiell in ähnlichen regulatorischen Schritten involviert. Im späteren Stadium der Entwicklung (E16,5) ist Hdac4 noch in proliferierenden Chondrozyten und in Osteoblasten der Trabekel und des Periost exprimiert (Abbildung 4-4d-e). Zumindest in den proliferierenden Chondrozyten kommen somit sowohl Trps1, als auch Hdac4 parallel vor und können somit ähnliche Schritte der Chondrozyten Differenzierung und enchondralen Ossifikation regulieren. Die Negativkontrollen (Abbildung 4-5) des 1. (a) und 2. Antikörpers (b) zeigen keine Hintergrundfärbung.

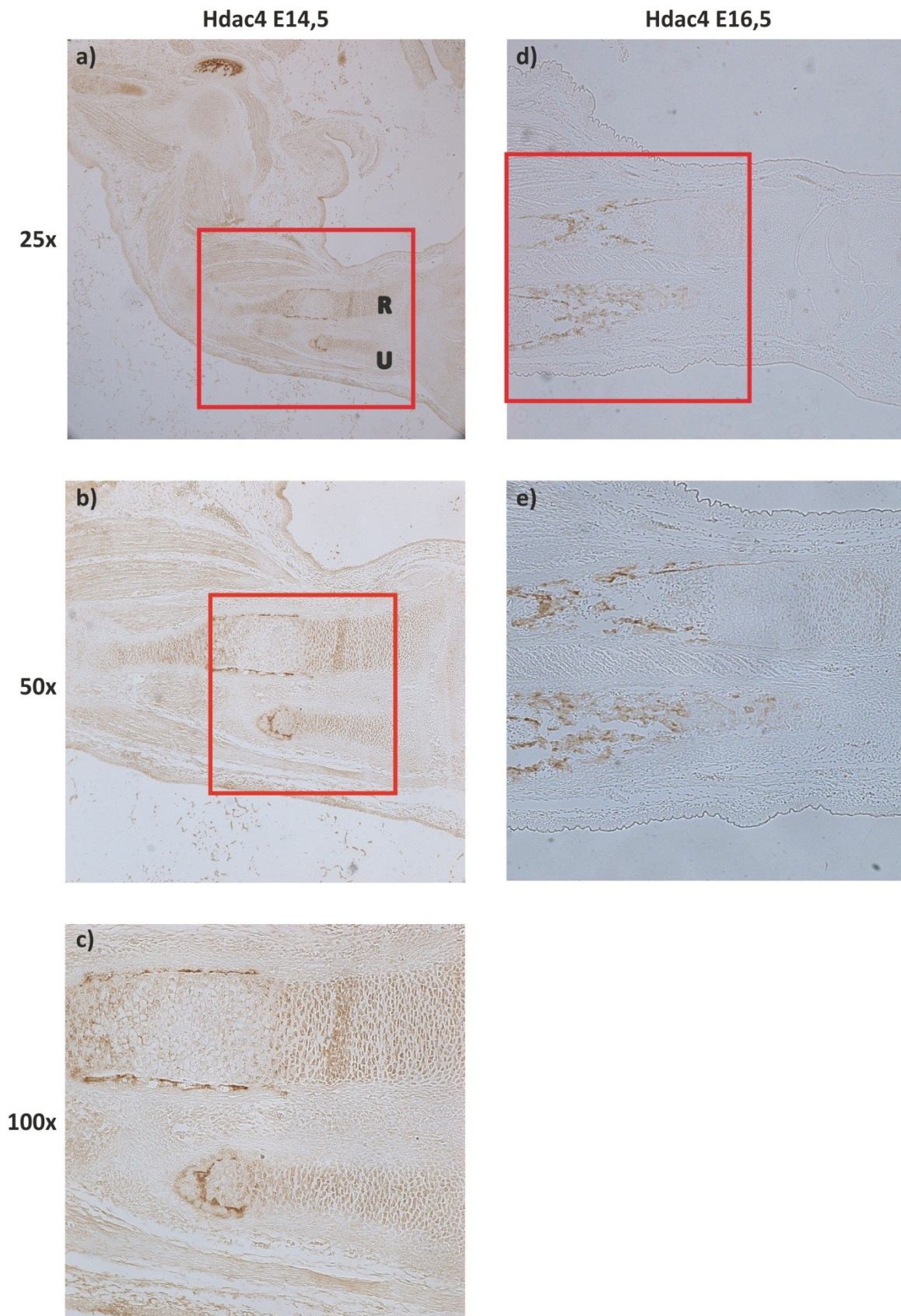


Abbildung 4-4: Hdac4 Protein wird in proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten und Osteoblasten exprimiert

Immunhistochemische Hdac4 Protein Färbung auf Schnitten der Vorderextremitäten von E14,5 (a-c) und E16,5 (d-e) Wildtyp Mäusen. Die roten Rechtecke zeigen jeweils den Ausschnitt der nächsten

Vergrößerung. (a, d) 25x, (b, e) 50x und (c) 100x Vergrößerung. U=Ulna, R=Radius. Hdac4 wird in proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten von E14,5 Mäusen (a-c) und in Osteoblasten (d-e) von E16,5 Mäusen exprimiert.

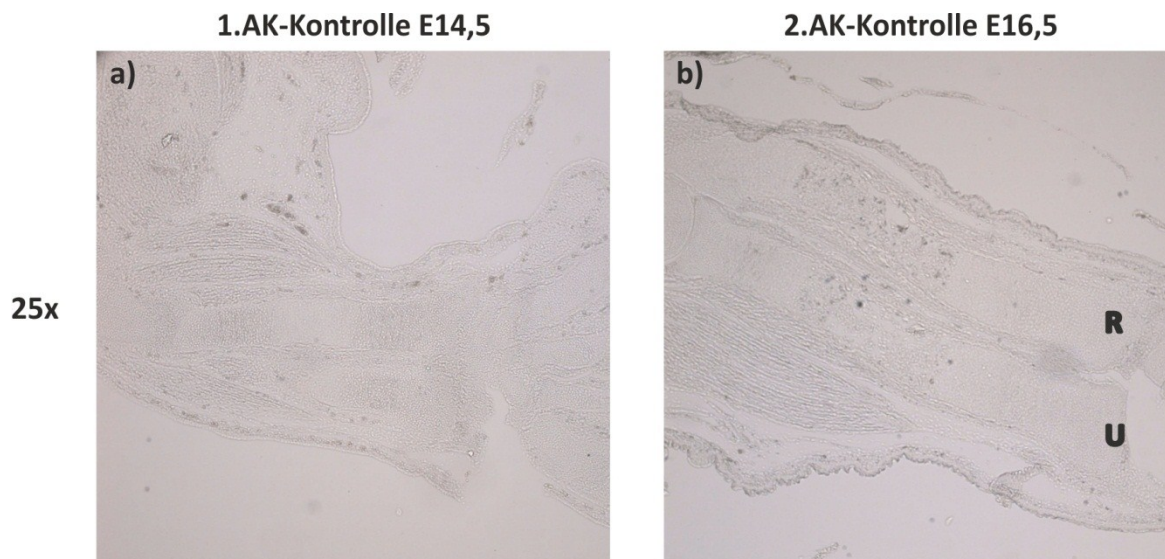


Abbildung 4-5: Negativkontrollen der Hdac4 Färbung zeigen keine Hintergrundfärbung.

Immunhistochemische Kontrollfärbung auf E14,5 (a) und E16,5 (b) Schnitten der Vorderextremitäten von Wildtyp Mäusen. **(a)** Die Negativkontrolle, bei der nur der 1. Antikörper (Hdac4 Antikörper) verwendet wurde, zeigt genauso wie die Negativkontrolle mit dem 2. Antikörper (sekundärer HRP-gekoppelter Antikörper) **(b)** keine Hintergrundfärbung. Vergrößerung: 25x. R=Radius, U=Ulna.

4.1.4. Hdac4 wird in ATDC5 Zellen kontinuierlich während der Differenzierung exprimiert

Die parallele Expression der Proteine Trps1 und Hdac4 wurde auch die chondrogenen ATDC5 Zelllinie während der Differenzierung getestet. Dafür wurden die Zelllysate der unterschiedlich weit differenzierten ATDC5 Zellen mittels Westernblot und Hdac4 Detektion analysiert (Abbildung 4-6). Es ist deutlich zu erkennen, dass das Hdac4 Protein kontinuierlich und konstant während der Differenzierung und auch in nicht differenzierenden ATDC5 Zellen exprimiert wird. Während der Differenzierung findet somit keine Hochregulierung der Hdac4 Proteinmenge statt. In ATDC5 Zellen werden somit sowohl Trps1, als auch Hdac4 exprimiert. ATDC5 Zellen können somit für Differenzierungs- und Interaktionsanalysen, die Hdac4 und Trps1 betreffen, verwendet werden.

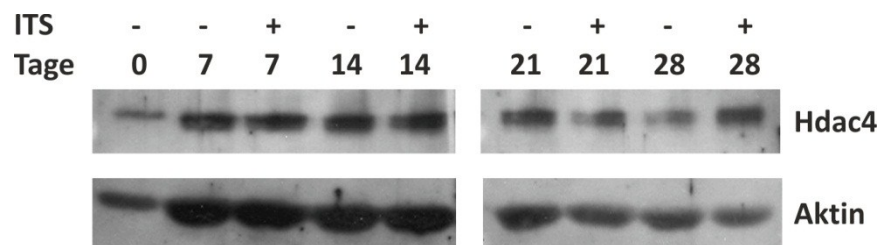


Abbildung 4-6: Hdac4 wird kontinuierlich und konstant in differenzierenden ATDC5 Zellen exprimiert.

Hdac4 und Aktin Westernblot von differenzierenden und nicht differenzierenden ATDC5 Lysaten nach 0, 7, 14, 21 und 28 Tagen. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1% ITS differenziert. Hdac4 ist zu allen Zeitpunkten kontinuierlich und konstant nachzuweisen. Der Aktin Westernblot dient als Ladekontrolle.

4.1.5. Hdac6 wird in allen Chondrozyten exprimiert

Auf Schnitten der Vorderextremitäten der Stadien E14,5 und E16,5 von Wildtyp Mäusen wurde eine immunhistochemische Hdac6 Antikörperfärbung durchgeführt, um die Lokalisation des Hdac6 Proteins während der enchondralen Ossifikation und speziell der Chondrozyten Differenzierung zu ermitteln und mit der Trps1 Expression zu vergleichen.

Hdac6 wird im Stadium E14,5 in allen Chondrozyten exprimiert (Abbildung 4-7a-d). Auch im Stadium E16,5 lässt sich eine Hdac6 Expression in allen Chondrozyten und in Osteoblasten der Trabekel erkennen (Abbildung 4-7e-g). Die Hdac6 Expression in distalen, proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten legt nahe, dass Hdac6 und Trps1 in diesen Zellen parallel exprimiert werden und somit potentiell auch gemeinsame Schritte der Chondrozyten Differenzierung regulieren bzw. auf Proteinebene physisch interagieren können. Die Negativkontrollen (Abbildung 4-8) mit den beiden einzeln eingesetzten Antikörpern zeigen keine Hintergrundfärbung.

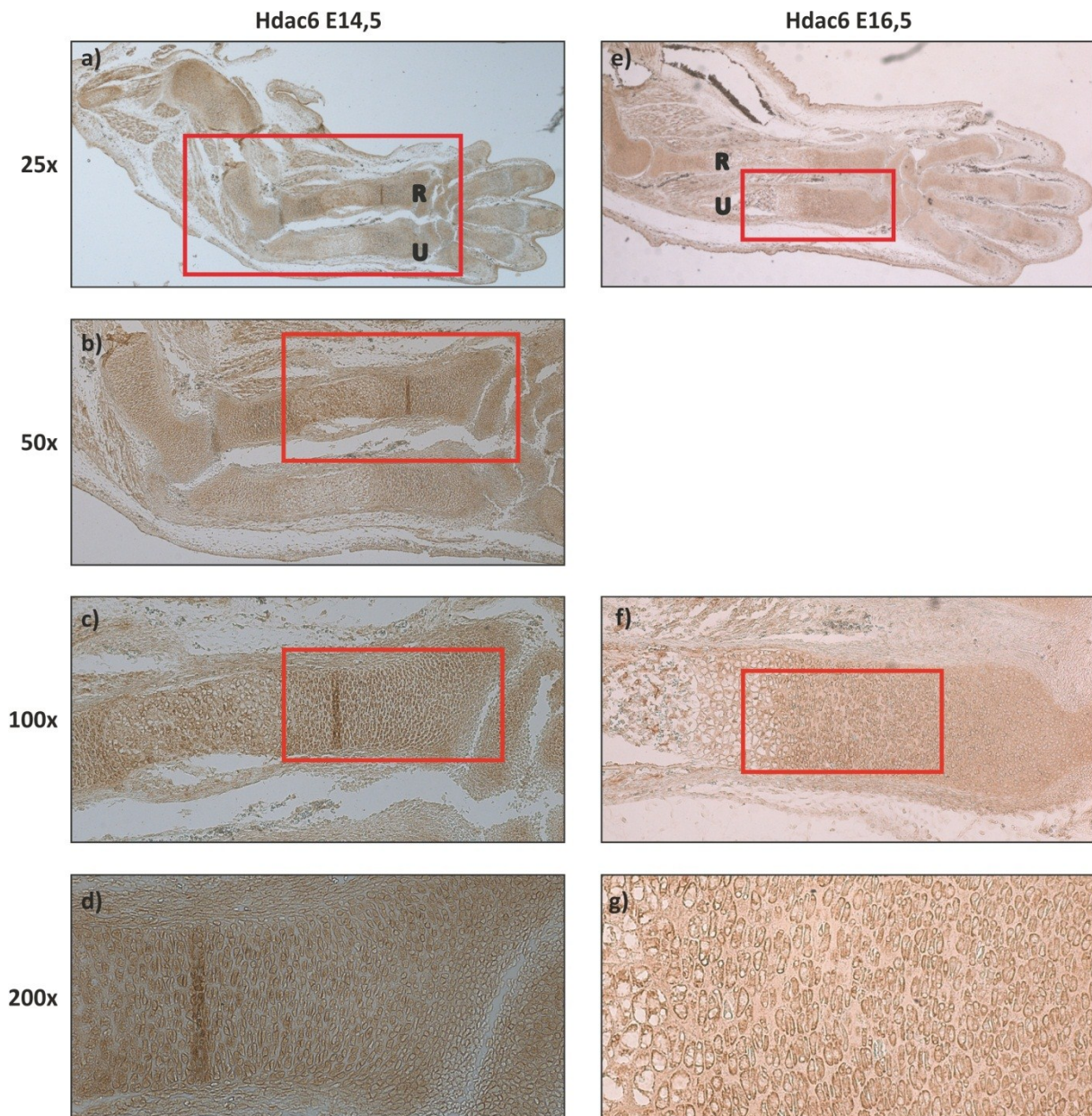


Abbildung 4-7: Hdac6 ist in allen Chondrozyten und trabekulären Osteoblasten exprimiert.

Immunhistochemische Hdac6 Protein Färbung auf Schnitten der Vorderextremitäten von E14,5 (**a-d**) und E16,5 (**e-g**) Wildtyp Mäusen. Die roten Rechtecke zeigen jeweils den Ausschnitt der nächsten Vergrößerung. (a, e) 25x, (b) 50x, (c, f) 100x und (d, g) 200x Vergrößerung. U=Ulna, R=Radius. Hdac6 wird in allen Chondrozyten und Osteoblasten der Trabekel exprimiert und kommt parallel zur Trps1 Expression vor.

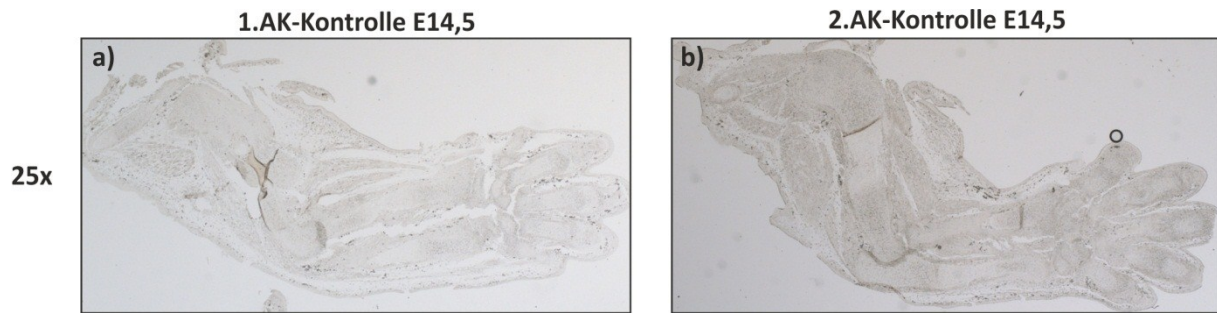


Abbildung 4-8: Negativkontrollen der Hdac6 Färbung zeigen keine Hintergrundfärbung.

Immunhistochemische Kontrollfärbung auf E14,5 Schnitten der Vorderextremitäten von Wildtyp Mäusen. **(a)** Die Negativkontrolle bei der nur der 1. Antikörper (Hdac6 Antikörper) verwendet wurde, zeigt genauso wie die Negativkontrolle mit dem 2. Antikörper (sekundärer HRP-gekoppelter Antikörper) **(b)** keine Hintergrundfärbung. Vergrößerung: 25x.

4.1.6. Die Hdac6 Expression beginnt nach sieben Tagen Differenzierung

Die Hdac6 Expression während der ATDC5 Differenzierung wurde mittels Westernblot analysiert. Dafür wurden ATDC5 Zellen über 21 Tage durch Zugabe von 1% ITS differenziert und die jeweiligen Lysate zu den Zeitpunkten 7, 14 und 21 Tage auf Hdac6 Expression untersucht (Abbildung 4-9). Es wurde ein spezifischer Hdac6 Antikörper verwendet. Die Hdac6 Expression startet ab Tag 7 der Differenzierung und steigert sich bis zu Tag 21 deutlich. Werden ATDC5 Zellen unter nicht differenzierenden Bedingungen gehaltenen, startet die Hdac6 Expression ab Tag 14 und ist an Tag 21 noch leicht erhöht. Im Vergleich zu differenzierenden Zellen ist die Hdac6 Expression aber deutlich geringer. ATDC5 Zellen können somit ebenfalls als Modell für die Analyse der Rolle von Hdac6 während der Chondrozyten Differenzierung und zu Interaktionsanalysen mit Trps1 verwendet werden.

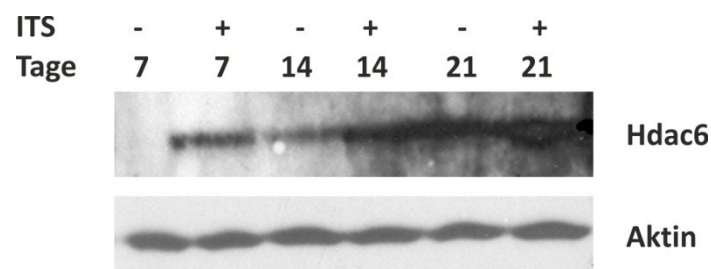


Abbildung 4-9: Die Hdac6 Expression startet an Tag 7 der ATDC5 Differenzierung.

Hdac6 und Aktin Westernblot von differenzierenden und nicht differenzierenden ATDC5 Lysaten nach 7, 14 und 21 Tagen. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1% ITS differenziert. Hdac6 wird ab Tag sieben exprimiert, wobei sich die Expression bis Tag 21 steigert. In nicht differenzierenden ATDC5 Zellen startet die Expression am Tag 14, ist aber geringer als die der differenzierenden Zellen. Der Aktin Westernblot dient als Ladekontrolle.

4.2. Trps1 interagiert mit Hdac Proteinen

Yeast Two-Hybrid Experimente zeigten, dass das Trps1 Protein mit einigen Hdac Proteinen interagieren kann (Kaiser, F., nicht publizierte Daten). Weiterhin sind die Proteine Trps1, Hdac4 und Hdac6 in parallelen Bereichen (proliferierende und prähypertrophe Chondrozyten) während der enchondralen Ossifikation und ATDC5 Zellen exprimiert. Aus diesem Grund wurde mittels Co-Immunpräzipitation (Co-IP) untersucht, ob Trps1 und Hdac Proteine auf Proteinebene interagieren können. Dafür wurden spezifische Antikörper gegen Trps1 und gegen verschiedene Hdac Proteine verwendet wurden. Durchgeführt wurden die Co-IPs in Zelllysaten, die aus HEK293 EBNA und ATDC5 Zellen gewonnen wurden. In beiden Zelltypen sind Trps1 und Hdac Proteine endogen stark exprimiert. HEK293 EBNA Zellen sind leicht zu transfizieren und in der chondrogenen ATDC5 Zelllinie lassen sich Interaktionen während der Differenzierung untersuchen.

4.2.1. Trps1 interagiert mit Hdac4

Hdac4 ist ein negativer Regulator des Chondrozyten Hauptregulators Runx2 und agiert an ähnlichen Schritten der Chondrozyten Differenzierung wie Trps1 (Vega et al., 2004; Wuelling et al., 2009). Daher wurde eine Interaktion dieser beiden Proteine untersucht.

Um eine Interaktion aus beiden Richtungen nachzuweisen, wurden für die Co-IP Antikörper gegen Trps1 und Hdac4 in ATDC5 Zelllysaten verwendet. Die Zelllysate und Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und die Proteine mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Wurde ein Trps1 Antikörper (Abbildung 4-10a) für die Co-IP eingesetzt, konnten Trps1 und auch Hdac4 im Präzipitat (IP Spur) mittels Westernblot nachgewiesen werden. Dasselbe Ergebnis konnte bei der Verwendung eines Hdac4 Antikörpers (Abbildung 4-10b) bei einer Co-IP in ATDC5 Lysaten aus der anderen Richtung erzielt werden. Demnach präzipitieren Trps1 und Hdac4 in demselben Proteinkomplex. Dieses spricht für eine Assoziation beider Proteine in ATDC5 Zellen.

Trps1 enthält neun vorhergesagte Zinkfinger, die eine Interaktion zwischen beiden Proteinen mediierten könnten. Um herauszufinden, welche Trps1 Domäne für eine Interaktion mit Hdac4 verantwortlich ist, wurden Co-IP Experimente mit drei verschiedenen Trps1 Deletionsmutanten (Abbildung 4-10c) durchgeführt, die unterschiedliche Teile des Trps1 Proteins repräsentieren. Das Trps1-F5 Fragment besteht aus den letzten sechs N-terminalen

Zinkfingern. Trps1-F6 besteht ebenfalls aus dem N-terminalen Bereich des Trps1 Proteins ab Zinkfinger vier, jedoch fehlen die beiden Zinkfinger acht und neun vom Ikaros Typ. Trps1-F10 enthält nur die Zinkfinger vier bis sechs. Die Trps1 Deletionskonstrukte sind jeweils mit einem C-terminalen Flag-Tag markiert (Kaiser, F., Universität Lübeck) und wurden in HEK293 EBNA Zellen überexprimiert, bevor mittels eines Flag-Tag spezifischen Antikörpers mögliche Trps1-Komplexe aus dem Zelllysate präzipitiert wurden. Mittels Westernblot wurden die präzipitierten Komplexe auf Trps1-Flag und Hdac4 Protein untersucht.

Die Trps1 Fragmente F6 und F10 interagieren nicht mit Hdac4, während das Trps1 Fragment F5 mit Hdac4 präzipitiert und somit interagiert (Abbildung 4-10d). Das F5 Fragment ist der C-terminale Teil des Trps1 Proteins, der die letzten sechs Zinkfinger enthält. Folglich sind die letzten sechs Zinkfinger für eine Interaktion mit Hdac4 nötig.

Es konnte gezeigt werden, dass Trps1 und Hdac4 auf Proteinebene interagieren. Es ist bekannt, dass sowohl Trps1 (eigene nicht gezeigte Daten) als auch Hdac4 (Vega et al., 2004) sowohl zytoplasmatisch, als auch nukleär in der Zelle vorkommen und eine Funktion dieser Proteine, durch unterschiedliche Lokalisationen, reguliert wird.

Es wurde untersucht wo die Interaktion zwischen Trps1 und Hdac4 stattfindet. Dafür wurden Zelllysate von undifferenzierten (ohne ITS Behandlung) und differenzierten (mit ITS Behandlung) ATDC5 Zellen fraktioniert, so dass eine zytoplasmatische, sowie eine nukleäre Fraktion vorlagen. In diesen Fraktionen wurden dann Co-IPs mit einem Trps1 spezifischen Antikörper durchgeführt und die Menge des co-präzipitierten Hdac4 Proteins mittels Hdac4 Westernblot analysiert. Hdac4 co-präzipitiert mit Trps1 sowohl im Zytoplasma, als auch in der nukleären Fraktion von undifferenzierten (-ITS) und differenzierten (+ITS) ATDC5 Zellen (Abbildung 4-10e oben). Das Verhältnis des co-präzipitierten (IP Spur) Hdac4 Proteins zum eingesetzten Protein (IN Spur) ist in den nukleären Fraktionen deutlich höher, als in den zytoplasmatischen Fraktionen. Vor allen in den differenzierten Lysaten ist die stärkste Hdac4 Bande nach einer Co-IP zu erkennen. Diese Ergebnisse sprechen für eine Trps1-Hdac4 Interaktion, die hauptsächlich im Nukleus von differenzierten ATDC5 Zellen stattfindet. RhoA (Zytoplasma Marker) und Lamin A (Nukleus Marker) Westernblots (Abbildung 4-10e unten) der einzelnen Fraktionen zeigen als Kontrolle, dass die Fraktionen sauber und ohne Kreuzkontaminationen, mit Proteinen der jeweils anderen Fraktion, fraktioniert wurden.

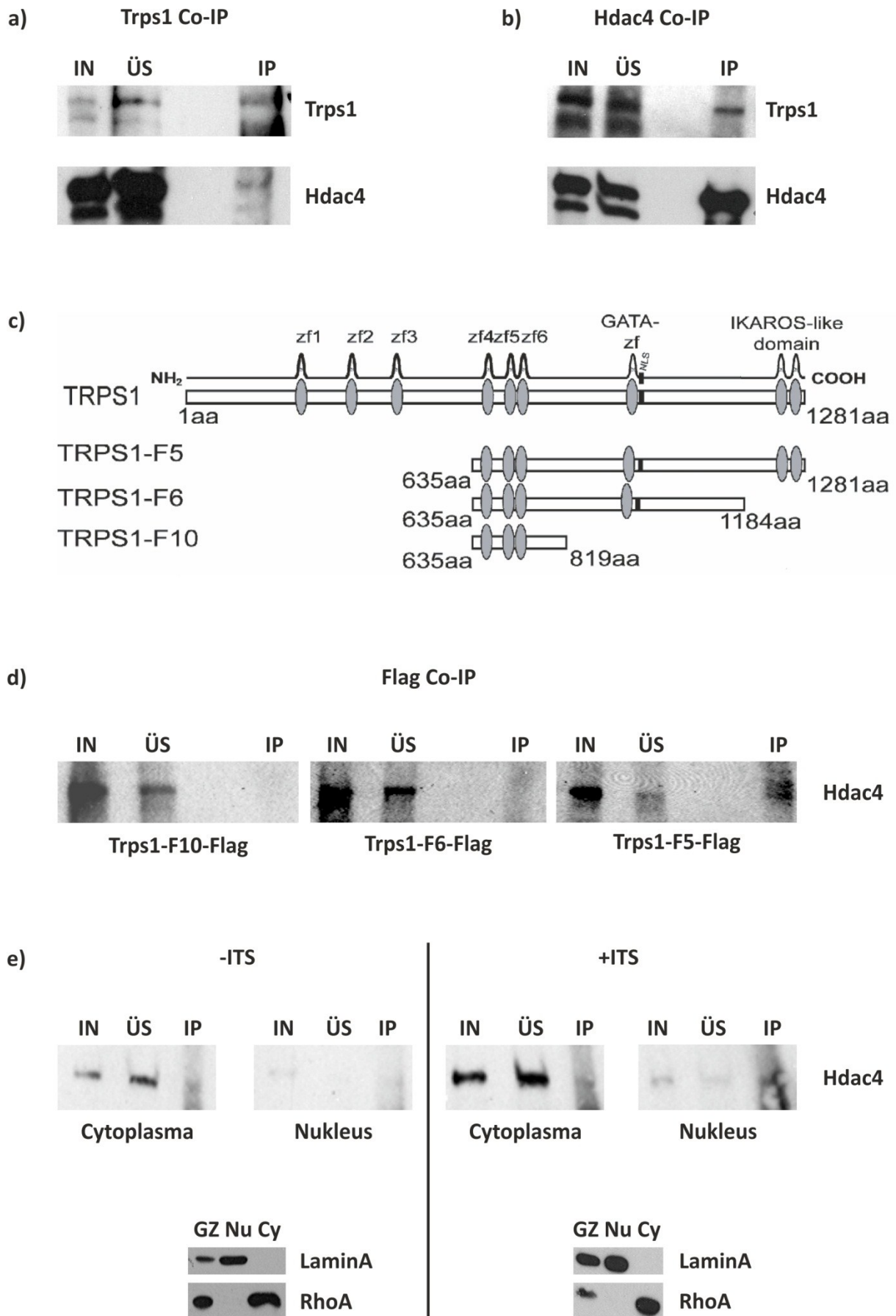


Abbildung 4-10: Trps1 und Hdac4 interagieren auf Proteinebene.

(a-b) Trps1 und Hdac4 Westernblots nach Trps1 und Hdac4 Co-IPs in ATDC5 Zellen. Trps1 und Hdac4 sind in beiden Präzipitaten nachzuweisen. **(c)** Verwendete Trps1 Deletionskonstrukte zur Trps1 Domänenbestimmung, die für eine Hdac4 Interaktion notwendig ist. **(d)** Hdac4 Western blot nach Expression der Trps1 Deletionskonstrukte in HEK293 EBNA Zellen und Flag Co-IP. Hdac4 präzipitiert zusammen mit dem Trps1-F5 Fragment. **(e)** GZ=Ganzzelllysate, Nu=Nukleus Fraktion, Cy=Zytoplasma Fraktion. (Oben) Hdac4 Western blot nach der Fraktionierung von differenzierten (+ITS) und undifferenzierten (-ITS) ATDC5 Zellen. Hdac4 präzipitiert am stärksten in der nukleären Fraktion von differenzierten ATDC5 Zellen. (Unten) Lamin A und RhoA Westernblots der fraktionierten ATDC5 Zelllysate. Die einzelnen Fraktionen sind rein und weisen keine Kontaminationen mit Proteinen der jeweils anderen Fraktion auf. IN=Input, ÜS=Überstand, IP=Co-IP

4.2.2. Trps1 interagiert mit Hdac6

Trps1 und Hdac6 sind in parallelen Regionen während der enchondralen Ossifikation und in ATDC5 Zellen exprimiert (4.1.1 und 4.1.5). Daher wurde eine mögliche Interaktion der Proteine Trps1 und Hdac6 mittels Co-IP analysiert. Dafür wurden mittels Trps1 und Hdac6 spezifischen Antikörpern Co-IPs in differenzierten ATDC5 Zellen gegen die endogenen Proteine durchgeführt. Die Präzipitate wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western blot wurden die co-präzipitierten Proteine nachgewiesen.

Sowohl Trps1, als auch Hdac6 können im Western blot nach einer Co-IP mit einem Trps1 Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 4-11a). Auch eine Immunpräzipitation mit einem Hdac6 spezifischen Antikörper resultiert in einer Präzipitation beider Proteine (Abbildung 4-11b). Diese Ergebnisse sprechen für eine physische Interaktion von Trps1 und Hdac6.

Weiterhin konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Trps1 auch mit Hdac1, jedoch nicht mit Hdac2, auf Proteinebene interagiert (Co-IP, nicht gezeigte Daten von Carina Moll).

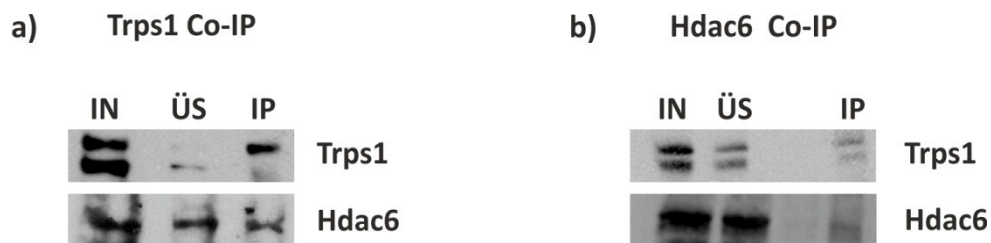


Abbildung 4-11: Trps1 und Hdac6 interagieren auf Proteinebene

(a) Trps1 und Hdac6 Westernblots nach einer Immunpräzipitation mit einem Trps1 Antikörper. Trps1 und Hdac6 sind im Präzipitat (IP) nachzuweisen. (b) Trps1 und Hdac6 Westernblot nach einer Immunpräzipitation mit einem Hdac6 Antikörper. Im Präzipitat (IP) sind Trps1 und Hdac6 nachweisbar. IN=Input, ÜS=Überstand, IP=Co-IP.

4.3. Trps1 modifiziert die Hdac Proteinfunktion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Trps1 mit Hdac4 und mit Hdac6 auf Proteinebene interagiert. Um die biologische Funktion dieser Interaktion aufzuschlüsseln, wurden Folgen dieser Interaktion auf Zielproteine der Deacetylasen untersucht. Acetylierte Lysine an den Positionen Neun und 18 des Histons H3 (H3K9ac, H3K18ac) sind zwei der Hauptzielstellen von Hdac Proteinen. Hdac Proteine deacetylieren diese und andere Lysine der Histone, welches zu hypoacetylierten Histonen führt.

Es wurde der Acetylierungsgrad des Histons H3 am Lysin Neun (H3K9) und 18 (H3K18) in HEK293 EBNA, ATDC5 Zellen und in Proteinextrakten aus Extremitäten von Wildtyp (*Trps1*^{+/+}) und *Trps1*^{-/-} Mäusen mittels Westernblot und H3, H3K9ac und H3K18ac spezifischen Antikörpern analysiert. Dabei wurde unter anderem ein Trps1 DNA-Sequenz enthaltendes Plasmid (pFlag-Trps1) in Zellkultur (HEK293 EBNA und ATDC5 Zellen) überexprimiert oder der endogene Zustand *in vivo* in Maus-Arm-Extrakten analysiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit Trichostatin A (TSA) behandelt. TSA inhibiert alle Deacetylasen und führt somit zu einer Hyperacetylierung.

4.3.1. Trps1 reduziert die H3K9 und H3K18 Acetylierung

Im Westernblot (Abbildung 4-12) ist die Änderung im H3K9 und H3K18 Acetylierungsgehalt nach einer Modifikation der Trps1 Protein Menge zu erkennen. Eine Überexpression des Trps1 Konstruktes resultiert in einer deutlich geringeren H3K9 und H3K18 Acetylierung in HEK293 EBNA (Abbildung 4-12a) und ATDC5 Zellen (Abbildung 4-12b). Die mit TSA

behandelten Zellen zeigen eine stark erhöhte H3K9 und H3K18 Acetylierung, so dass die Acetylierung mittels Trps1 Überexpression und Hdac Inhibition modifiziert werden konnte. Diese Daten legen nahe, dass die Überexpression von Trps1 entweder die Rekrutierung der Hdac Proteine an ihre Zielhistone oder die katalytische Aktivität am Hdac Substrat H3K9ac und H3K18ac moduliert.

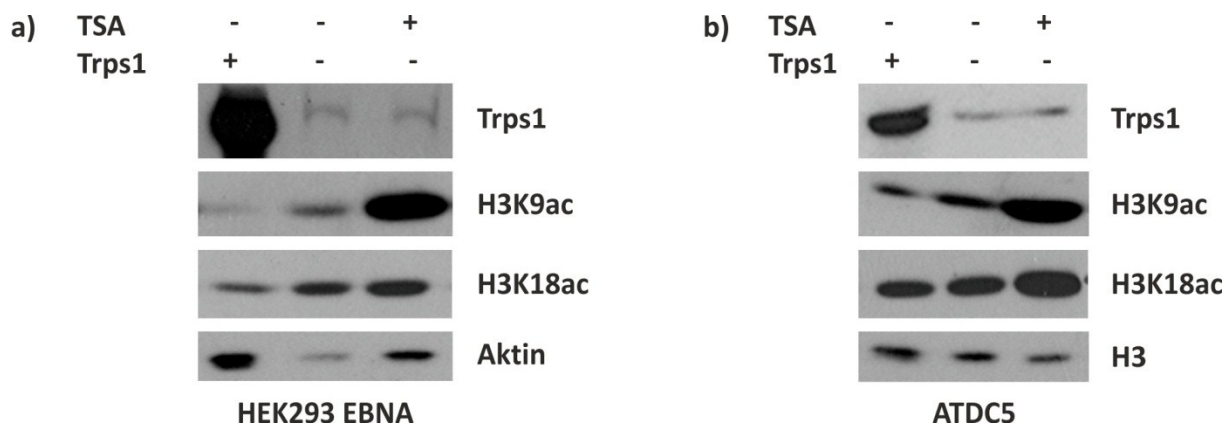


Abbildung 4-12: Trps1 reduziert die H3K9 und H3K18 Acetylierung

(a) Westernblots nach pFlag-Trps1 Überexpression oder 10 nM TSA Behandlung in HEK293 EBNA Zellen. Eine Trps1 Überexpression bewirkt eine reduzierte, eine TSA Behandlung eine gesteigerte H3K9 und H3K18 Acetylierung. Aktin dient als Ladekontrolle. **(b)** Westernblots nach pFlag-Trps1 Überexpression und 10 nM TSA Behandlung in ATDC5 Zellen. Trps1 reduziert die H3K9 und H3K18 Acetylierung, während TSA sie erhöht. H3 dient als Ladekontrolle.

4.3.2. Trps1 Verlust erhöht die H3K9 und H3K18 Acetylierung

Es konnte gezeigt werden, dass eine Trps1 Überexpression in Zellkulturen eine Reduzierung der Histon H3K9 und H3K18 Acetylierung bewirkt. Es sollte nun untersucht werden, wie sich der Verlust von aktivem Trps1 auf die Histonacetylierung auswirkt. Dafür wurden Proteinextrakte aus Vordergliedmaßen von Wildtyp Mäusen (*Trps1*^{+/+}) mit Proteinextrakten von Trps1 Deletionsmutanten (*Trps1*^{-/-}), die kein funktionelles Trps1 Protein besitzen verglichen.

Proteinextrakte der *Trps1*^{-/-} Mäuse weisen eine erhöhte H3K9 (Abbildung 4-13a) und H3K18 (Abbildung 4-13b) Acetylierung im Vergleich zu ihren *Trps1*^{+/+} Wurfgeschwistern im Westernblot auf. Der Verlust von Trps1 hat demnach eine Histon Hyperacetylierung zur Folge. Somit bestätigen diese Ergebnisse die Schlussfolgerung, dass Trps1 die Aktivität der Hdac Proteine reguliert.

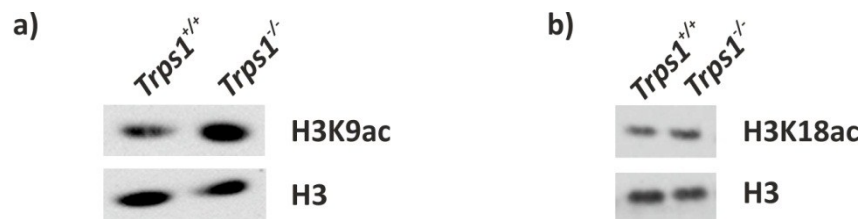


Abbildung 4-13: Trps1 Verlust resultiert in einer Histon Hyperacetylierung

(a) H3K9ac und H3 Westernblot von Arm-Extrakten von Wildtyp und *Trps1* Mutanten Mäusen. Die H3K9 Acetylierung ist in den Mutanten erhöht. (b) H3K18ac und H3 Westernblot von Arm-Extrakten von Wildtyp und *Trps1* Mutanten Mäusen. In *Trps1*^{-/-} Extrakten ist die Acetylierung des Histons am Lysin 18 erhöht.

Da die Änderung im Acetylierungsgehalt im Westernblot nur sehr gering ist, wurde die Änderung der Acetylierung gegenüber dem gesamt Histon H3 Gehalt mittels einer Pixel-Messung mit Hilfe der *ImageJ-Software* und einer Quotienten Bildung verifiziert. Extrakte aus *Trps1*^{-/-} Mäusen weisen ein größeres Verhältnis von H3K9ac zu H3 (0,89 zu 0,73) auf als Wildtyp Mäuse (Abbildung 4-14a). Auch am Lysin 18 ist in den Mutanten das Verhältnis von H3K18ac zu H3 signifikant größer (0,76 zu 0,64) als in den Wildtyp Mäusen (Abbildung 4-14b) und somit die Acetylierung sowohl am Histon H3K9, als auch am Histon H3K18 erhöht. Die qualitativen Ergebnisse der Westernblots konnten so quantitativ bestätigt werden.

Der Verlust der *Trps1* Proteinfunktion in den Deletionsmäusen resultiert entweder in einer schwächeren Rekrutierung der Hdac Proteine an die Histone oder einer geringeren Deacetylase Aktivität, so dass das Chromatin global hyperacetyliert vorliegt.

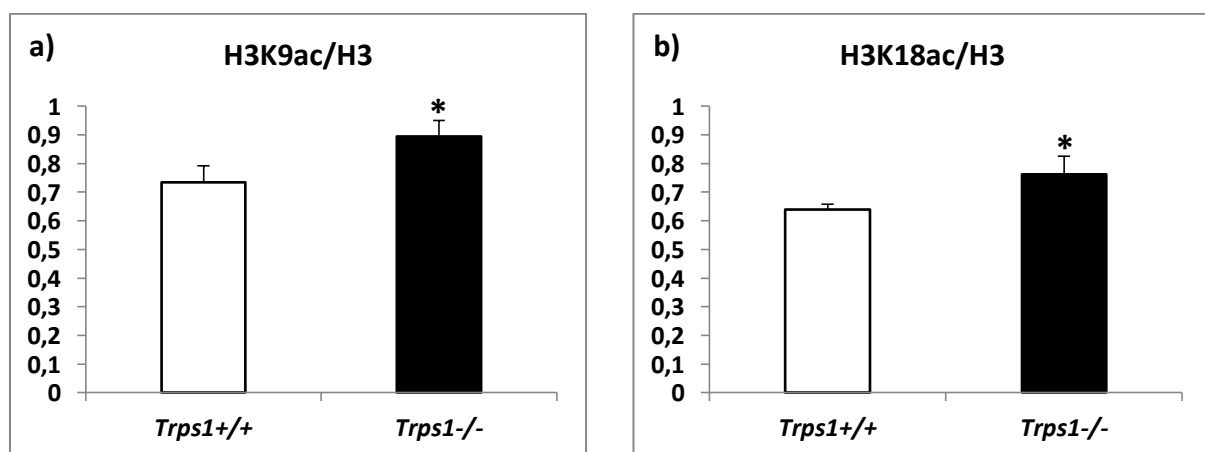


Abbildung 4-14: In Trps1 defizienten Mäusen sind Histone hyperacetyliert.

(a-b) Pixelmessung mittels *ImageJ Software* der H3K9ac und H3 (a) sowie H3K18ac und H3 (b) Westernblots der Arm-Extrakten von Wildtyp (*Trps1*^{+/+}) und *Trps1* Mutanten (*Trps1*^{-/-}) Mäusen. Dargestellt ist das Verhältnis H3K9ac zu H3 (a) und H3K18ac zu H3 (b). Das Verhältnis im Extrakt der Mutanten ist jeweils signifikant erhöht, was eine Hyperacetylierung zumindest an diesen beiden

Lysinen bedeutet. $n=3$; *: Signifikanz ($p<0,05$) gegen *Trps1*^{+/+}. Signifikanzen mittels unpaarigem, zweiseitigen t-Test bestimmt. Die den Graphiken zugrundeliegenden Werte siehe in Tabelle 9-1 im Anhang.

4.4. Trps1 erhöht die Hdac Proteinaktivität

Um die Frage zu beantworten, ob Trps1 Hdacs zu ihren Zielhistonen rekrutiert oder die Hdac Proteinaktivität erhöht, wurde ein Hdac Aktivitätstest (Calbiochem) durchgeführt. Mittels dieses Testes kann die Deacetylierungsaktivität von Hdac Proteinen in Zelllysaten und Proteinextrakten aus Extremitäten an einem artifiziellen Substrat fluorometrisch gemessen werden.

4.4.1. Trps1 steigert die Hdac Proteinaktivität in Zellkulturen

Es wurden Plasmide in HEK293 EBNA Zellen überexprimiert, die die Trps1 (pFlag-Trps1) und Hdac4 (pFlag-Hdac4) DNA-Sequenz beinhalten. Zum einen wurden die jeweiligen Plasmide einzeln, aber auch beide Konstrukte zusammen als Doppeltransfektion transfiziert. Im Westernblot kann die Trps1 (Abbildung 4-15a) und in die Hdac4 (Abbildung 4-15b) Überexpression und somit die erhöhten Proteinmengen der Zelllysate gesehen werden. Die Hdac4 Proteinmenge ist bei einer Doppeltransfektion mit dem Hdac4 und Trps1 Konstrukten im Vergleich zu untransfizierten oder nur mit dem Trps1 Plasmid transfizierten Zellen deutlich erhöht. Im Vergleich zur Einzeltransfektion mit dem Hdac4 Konstrukt ist aber weniger Hdac4 Protein detektierbar.

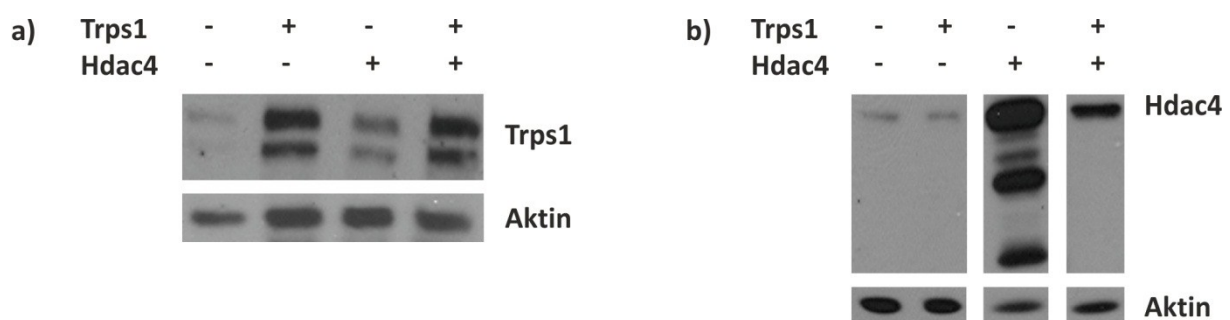


Abbildung 4-15: Trps1 und Hdac4 sind in HEK293 EBNA Zellen überexprimiert.

(a) Trps1 und Aktin (Ladekontrolle) Westernblots von HEK293 EBNA Zelllysaten nach pFlag-Trps1, pFlag-Hdac4 und einer Co-Expression beider Plasmide. Die Trps1 Proteinmenge ist jeweils erhöht, wenn das pFlag-Trps1 Konstrukt transfiziert wurde. **(b)** Hdac4 und Aktin (Ladekontrolle) Westernblots von HEK293 EBNA Zelllysaten nach pFlag-Trps1, pFlag-Hdac4 und einer Co-Expression beider

Plasmide. Die Hdac4 Proteinmenge ist jeweils erhöht, wenn das pFlag-Hdac4 Konstrukt transfiziert wurde. Der Aktin Westernblot dient als Ladekontrolle.

Die Hdac Aktivität in untransfizierten (u.t.) HEK293 EBNA Zellen wurde gleich 1 gesetzt. Die Überexpression des Trps1 Konstruktes erhöht die Hdac Aktivität signifikant um 9 %, während eine Transfektion mit dem Hdac4 Plasmid eine signifikante Erhöhung der Hdac Aktivität um 16 % in den Zelllysaten bewirkt. Interessanterweise war die gemessene Hdac Proteinaktivität in den, mit den Trps1 und Hdac4 Plasmiden, doppelt transfizierten HEK293 EBNA Zellen höher, nämlich signifikant weiter gesteigert um 20 % zu untransfizierten Zellen (Abbildung 4-16).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass Trps1 Hdac-Proteine in HEK293 EBNA Zellen aktivieren kann. Überexpression von Hdac4 bringt zusätzliche Hdac Aktivität in die Zelllysate. Die höchste Hdac Aktivität konnte nach einer Co-Expression von Trps1 und Hdac4 gemessen werden, was durch einen höheren Hdac4 Proteingehalt und aktivere Hdac4 Proteine in den Zellen erklärt werden kann. Überexprimiertes Trps1 bringt co-exprimierte Hdac4 Proteine in einen aktiveren Zustand. Die Doppelexpression von Trps1 und Hdac4 hat somit einen synergistischen Einfluss auf die Hdac Aktivität in HEK293 EBNA Zellen.

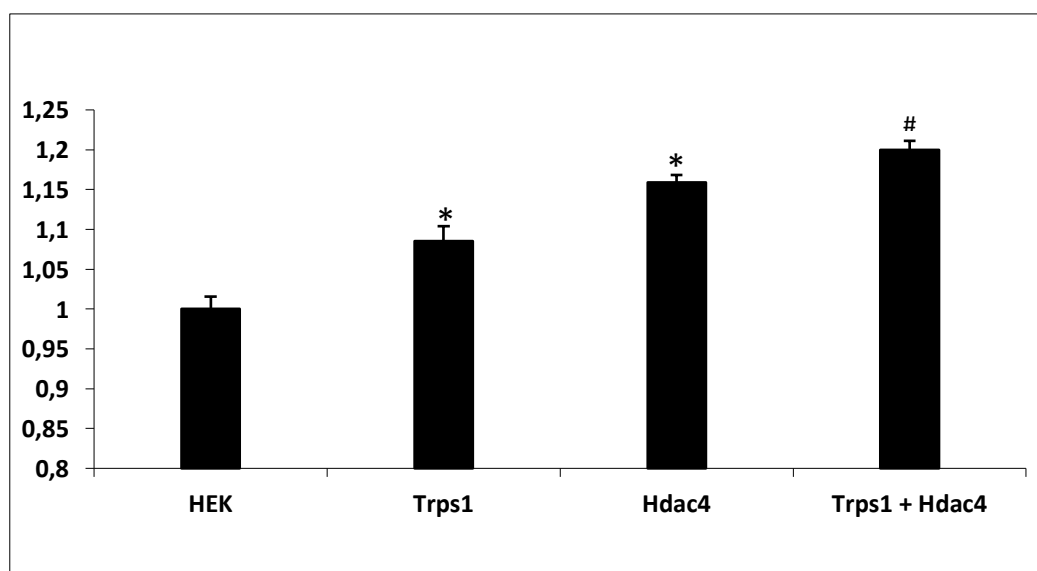


Abbildung 4-16: Trps1 aktiviert Hdac Proteine

Mittels eines Hdac Aktivitätstests (Calbiochem) gemessene Hdac Aktivitäten, in mit pFlag-Trps1, pFlag-Hdac4 und mit beiden Plasmiden transfizierten HEK293 EBNA Zellen. Das Trps1 (109%) und Hdac4 (116%) Plasmid erhöhen jeweils die Hdac Aktivität im Vergleich zu untransfizierten Zellen. Die Co-Expression erhöht die Aktivität nochmals auf 120%. Trps1 aktiviert somit Hdac Proteine. n=3, *: Signifikanz ($p < 0,01$) gegen untransfizierte Zellen; #: Signifikanz ($p < 0,01$) gegen Hdac4 transfizierte

Zellen. Signifikanzen mittels unpaarigem, zweiseitigen t-Test bestimmt. Die der Graphik zugrundeliegenden Werte siehe in Tabelle 9-2 im Anhang. u.t.=untransfizierte HEK293 EBNA Zellen.

4.4.2. Trps1 Verlust führt zu reduzierter Hdac Proteinaktivität *in vivo*

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine Überexpression von Trps1 die H3K9 und H3K18 Acetylierung senkt und die Hdac Proteinaktivität erhöht. Da in Proteinextrakten aus Vordergliedmaßen von Trps1 Deletionsmutanten die H3K9 Acetylierung erhöht war, wurde die Hdac Proteinaktivität in *Trps1*^{+/+} und *Trps1*^{-/-} Proteinextrakten gemessen. Als Kontrolle wurde mittels TSA die Hdac Aktivität in den Arm-Extrakten inhibiert, um zu zeigen, dass die Hdacs in den Extrakten aktiv sind und moduliert werden können. Die gemessene Aktivität in den *Trps1*^{+/+} Extrakten wurde gleich 1 gesetzt. Im *Trps1*^{-/-} Extrakt konnte eine um 5 % signifikant reduzierte Hdac Aktivität im Vergleich zum Wildtyp Extrakt gemessen werden (Abbildung 4-17). Extrakte, die die Trps1 Deletionsmutante und somit inaktives Trps1 beinhalten, zeigen eine geringere Hdac Proteinaktivität und so kann auch der erhöhte H3K9 und H3K18 Acetylierungsgehalt in diesen Extrakten erklärt werden. Das Fehlen von funktionalem Trps1 Protein senkt die Hdac Proteinaktivität *in vivo*.

Folglich kann argumentiert werden, dass Trps1 die Hdac Proteinaktivität mittels einer physischen Interaktion erhöht.

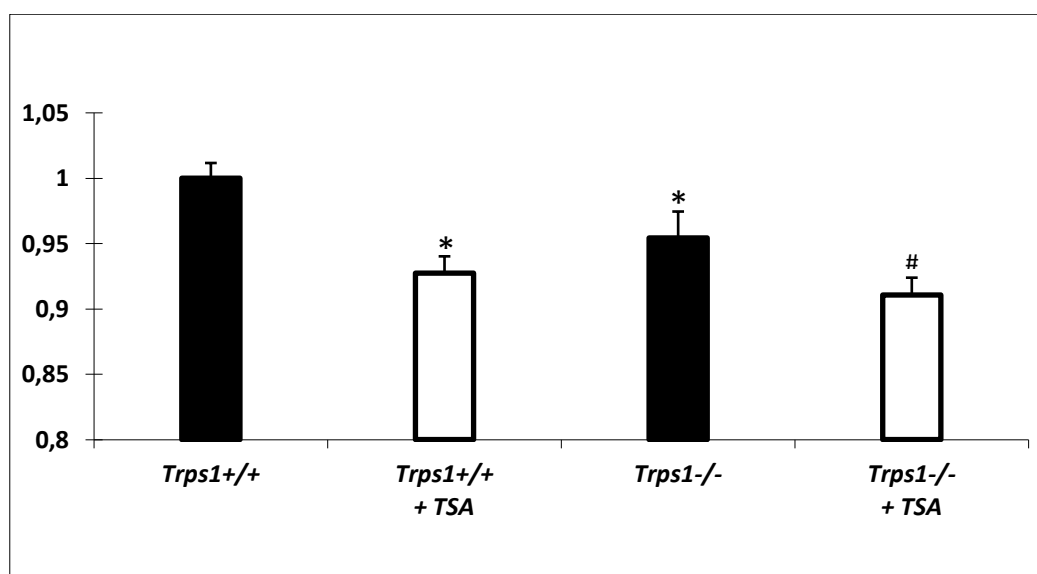


Abbildung 4-17: Hdac Aktivität in Arm-Extrakten von Wildtyp und Trps1 defizienten Mäusen

Gemessen wurde die Hdac Aktivität mittels des Calbiochem Aktivitätstests in Proteinextrakten aus Extremitäten von Wildtyp (*Trps1*^{+/+}) und Trps1 Deletionsmutanten (*Trps1*^{-/-}) Mäusen. Als Kontrollen wurden die Hdac Aktivitäten mit TSA inhibiert. *Trps1*^{-/-} Extrakte zeigen eine auf 95% gesenkte Hdac

Aktivität. n=3; *: Signifikanz ($p < 0,05$) gegen *Trps1*^{+/+}; #: Signifikanz ($p < 0,05$) gegen *Trps1*^{-/-}. Signifikanzen mittels unpaarigem, zweiseitigen t-Test bestimmt. Die der Graphik zugrundeliegenden Werte siehe in Tabelle 4-3 im Anhang.

4.5. Die Interaktion von Trps1 mit Hdac1 und Hdac4 ist verantwortlich für die erhöhte Hdac Proteinaktivität

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Trps1 die Hdac Proteinaktivität in Zellkulturexperimenten erhöht und bei Verlust von funktionalem Trps1 *in vivo* die Hdac Aktivität reduziert ist. Trps1 interagiert mit Hdac1, Hdac4 und Hdac6, jedoch nicht mit Hdac2, auf Proteinebene. Um zu untersuchen, welche Trps1-Hdac-Interaktion für die Erhöhung der Hdac Proteinfunktion verantwortlich ist, wurde der Hdac Aktivitätstest mit HEK293 EBNA Zelllysaten durchgeführt, nachdem mittels siRNA spezifisch einzelne Hdac Proteine herunterreguliert wurden. Es wurden Hdac1, Hdac2, Hdac4 und Hdac6 mittels spezifischen RNA-Oligomeren gegen einen Bereich der jeweiligen DNA-Sequenz, sowie Hdac1 Proteine mittels Mission esiRNA herunterreguliert. Gleichzeitig wurde in den Zellen das Trps1 Protein überexprimiert. Die Hdac Aktivitäten in diesen Zelllysaten wurde gemessen und mit den Aktivitäten der Zelllysate verglichen, in denen nur Trps1 überexprimiert bzw. nur die jeweiligen Hdac Proteine herunterreguliert wurden.

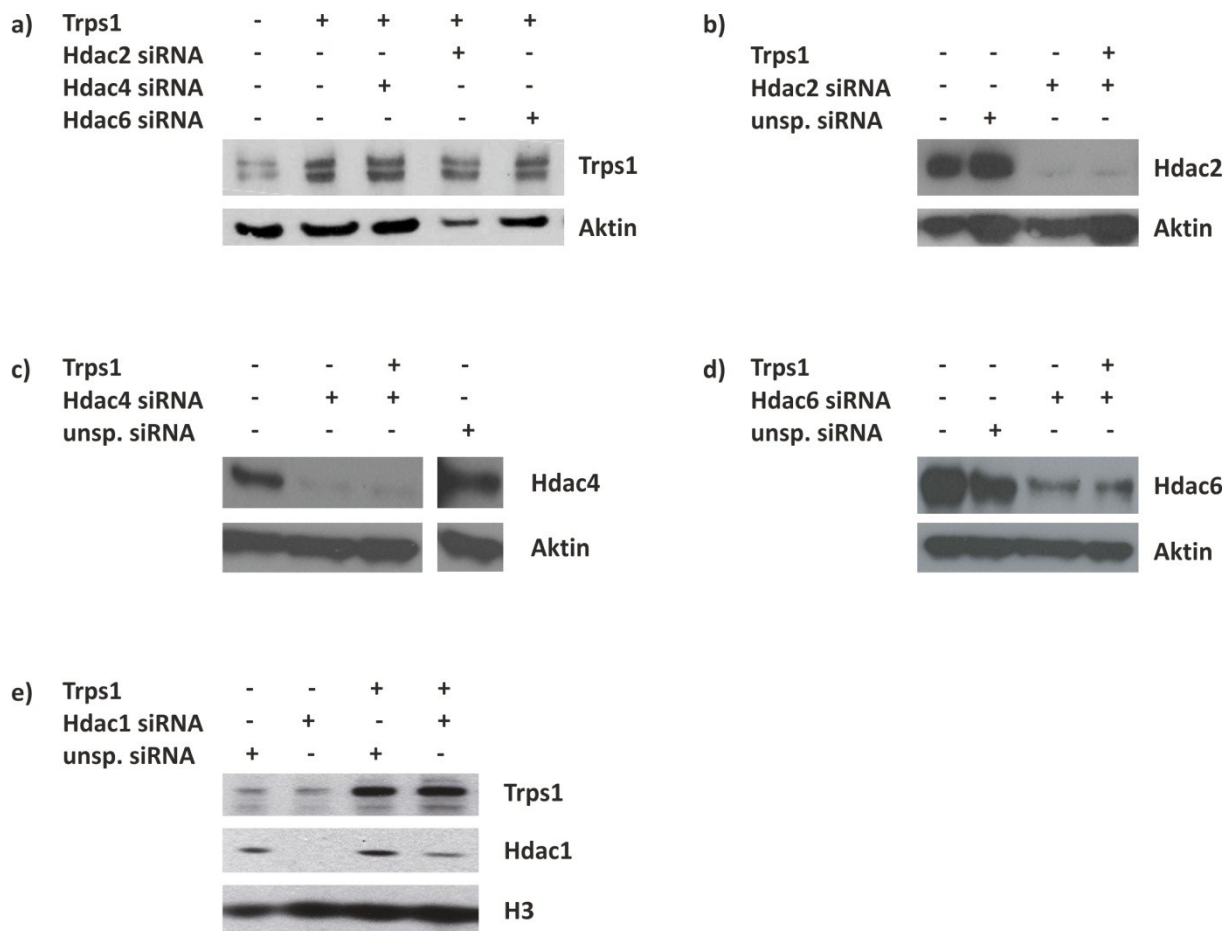


Abbildung 4-18: Trps1 ist in HEK293 EBNA Zellen überexprimiert und Hdac Proteine herunterreguliert.

(a) Trps1 und Aktin Westernblots nach pFlag-Trps1 Transfektion in HEK293 EBNA Zellen in Kombination mit Hdac2, Hdac4 und Hdac6 siRNA. Trps1 Protein ist in jeder Überexpression vermehrt nachweisbar. **(b)** Hdac2 und Aktin Westernblots nach Transfektion mit pFlag-Trps1, Hdac2 siRNA und unspezifischer (unsp.) siRNA in HEK293 EBNA Zellen. Hdac2 Protein ist nach Hdac2 siRNA Transfektion reduziert. **(c)** Hdac4 und Aktin Westernblots nach Transfektion mit pFlag-Trps1, Hdac4 siRNA und unspezifischer (unsp.) siRNA in HEK293 EBNA Zellen. Hdac4 Protein ist nach Hdac4 siRNA Transfektion reduziert. **(d)** Hdac6 und Aktin Westernblots nach Transfektion mit pFlag-Trps1, Hdac6 siRNA und unspezifischer (unsp.) siRNA in HEK293 EBNA Zellen. Hdac6 Protein ist nach Hdac6 siRNA Transfektion reduziert. **(e)** Trps1, Hdac1 und H3 Westernblots nach Transfektion mit pFlag-Trps1, Hdac1 esiRNA, ein von Krackeler Scientific hergestellter Mix aus fünf Plasmid kodierten RNA-Sequenzen gegen die Hdac1 cDNA Sequenz, und unspezifischer (unsp.) siRNA in HEK293 EBNA Zellen (Expression und Lysate von Carina Moll hergestell). Hdac1 Protein ist nach Hdac1 esiRNA Transfektion reduziert. Trps1 nach pFlag-Trps1 Transfektion erhöht. Die Aktin und H3 Westernblots dienen jeweils als Ladekontrolle.

Die Trps1 Proteinmenge ist in einzeln transfizierten, sowie in Zellen, die ebenfalls mit den Hdac2, Hdac4 und Hdac6 siRNAs transfiziert wurden, deutlich erhöht (Abbildung 4-18a). Die Hdac Proteinmengen sind nach den dazugehörigen spezifischen siRNA Transfektion herunterreguliert (Abbildung 4-18b-d). Die Trps1 Proteinmenge ist nach pFlag-Trps1 und Co-

Expression mit Hdac1 esiRNA Transfektion erhöht, die Hdac1 Proteinmenge reduziert (Abbildung 4-18e).

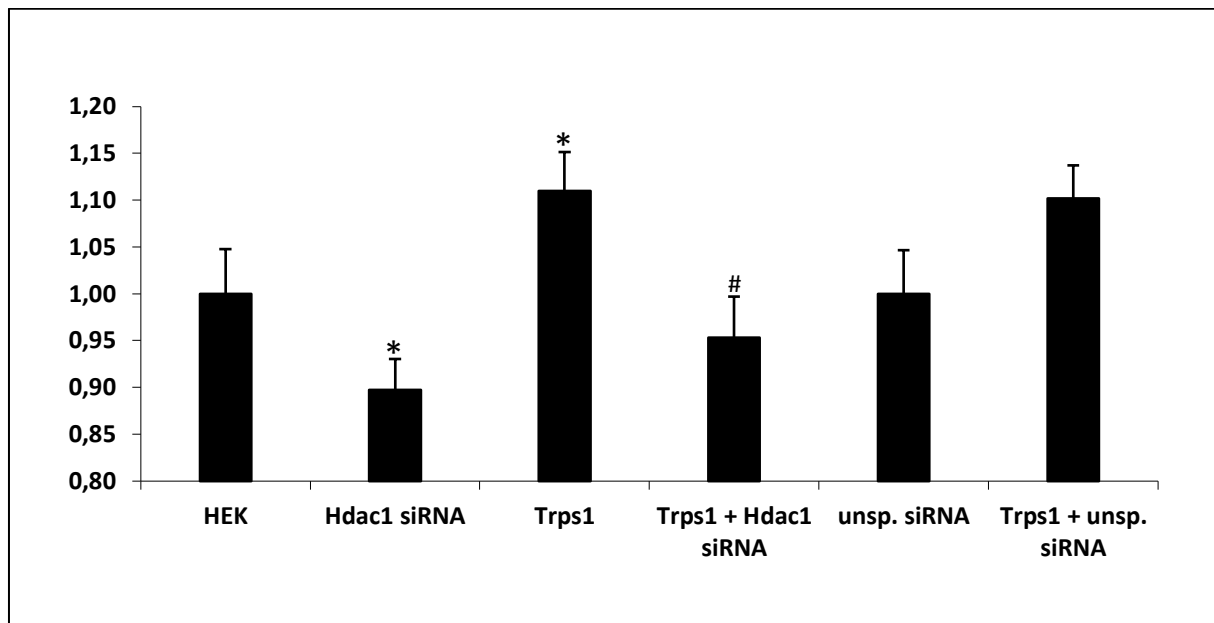


Abbildung 4-19: Hdac1 siRNA senkt die Trps1 abhängige Hdac Aktivitätserhöhung

Hdac Aktivitätstest (Calbiochem) von untransfizierten HEK293 EBNA Zelllysaten und HEK293 EBNA Zellen, die mit Hdac1 siRNA, pFlag-Trps1, unspezifischer (unsp.) siRNA und pFlag-Trps1 zusammen mit Hdac1 siRNA oder unsp. siRNA transfiziert wurden. Hdac1 siRNA senkt signifikant die Hdac Aktivität auf 90% und die durch Trps1 erhöhte (111%) Aktivität bei einer Co-Expression auf 95% des u.t. Niveaus. n=3; *: Signifikanz ($p < 0,05$) gegen untransfizierte (u.t.) Zellen; #: Signifikanz ($p < 0,05$) gegen Trps1 transfizierte Zellen. Signifikanzen mittels unpaarigem, zweiseitigen t-Test bestimmt. Die der Graphik zugrundeliegenden Werte siehe in Tabelle 9-4 im Anhang.

Die Hdac Proteinaktivität, die in untransfizierten HEK293 EBNA Zellen gemessen wurde, wurde gleich 1 gesetzt. Alle anderen Aktivitäten dann in Relation zu dieser gesetzt. HEK Zellen, die mit der Hdac1 siRNA transfiziert wurden, weisen eine Hdac Aktivität von unter 90 % auf. Mit Trps1 transfizierte Zellen zeigen eine Steigerung auf etwa 111 %. Beide Aktivitätsveränderungen sind signifikant. Co-exprimiert man zum Trps1 Konstrukt die Hdac1 siRNA, sinkt die Hdac Aktivität signifikant auf ca. 95 % der untransfizierten HEK-Zellen. Transfektionen mit einer unspezifischen siRNA allein haben keine Auswirkung auf die Hdac Aktivität. Transfiziert man die unspezifische siRNA zusammen mit dem Trps1 Plasmid, ist das Aktivitätsniveau in etwa auf Höhe der Trps1 Einzeltransfektion. Beide Veränderungen sind nicht signifikant zu den jeweiligen Vergleichsaktivitäten. Die Hdac1 siRNA konnte demnach die durch eine Trps1 Überexpression erhöhte Hdac Aktivität unter das untransfizierte HEK

Aktivitätsniveau senken (95 %), konnte aber nicht das Aktivitätsniveau der Transfektion mit der Hdac1 siRNA allein (90 %) erreichen (Abbildung 4-19).

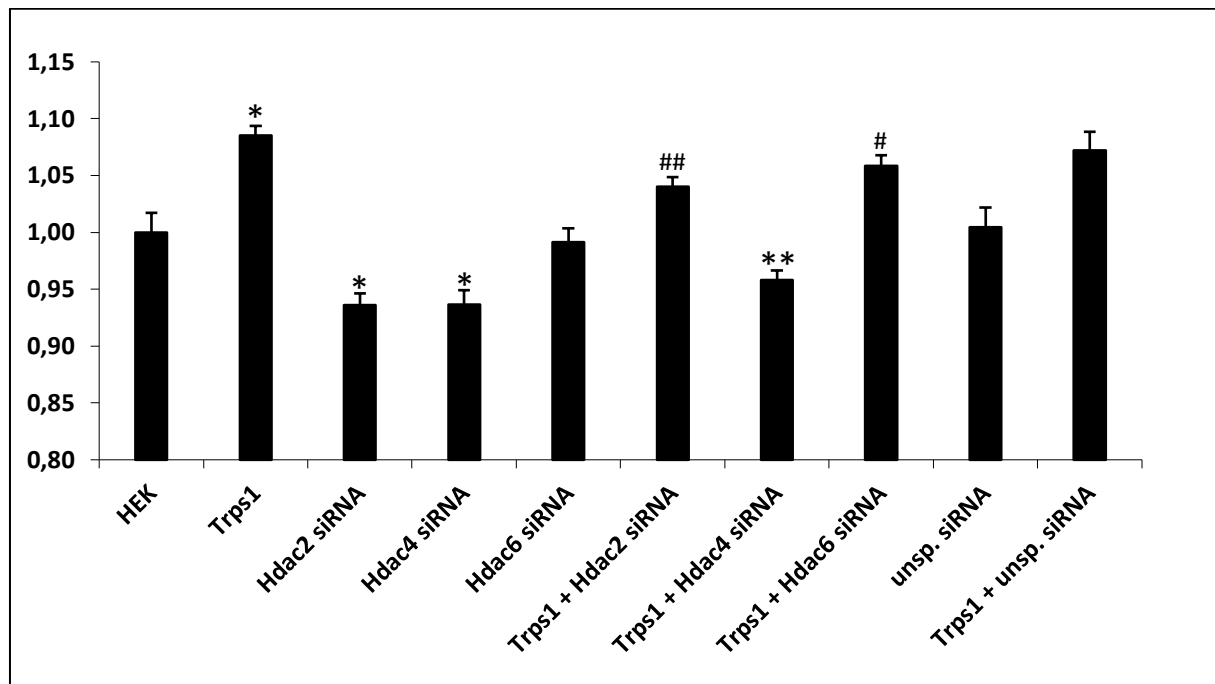


Abbildung 4-20: Hdac4 siRNA senkt die Trps1 abhängige Hdac Aktivitätserhöhung

Hdac Aktivitätstest (Calbiochem) von untransfizierten HEK293 EBNA Zelllysaten und HEK293 EBNA Zellen, die mit Hdac2, 4 und 6 siRNA, pFlag-Trps1, unspezifischer (unsp.) siRNA und pFlag-Trps1 zusammen mit Hdac2, 4 oder 6 siRNA oder unsp. siRNA transfiziert wurden. Die Hdac2 und 4 siRNAs senkt signifikant die Hdac Aktivität auf 94% der u.t. Zellen. Hdac 6 siRNA senkt die Aktivität auf 99%. Die Hdac2 und 6 siRNA senken die durch Trps1 erhöhte (109%) Aktivität bei einer Co-Expression auf 104% bzw. 106% des u.t. Niveaus. Die Hdac4 siRNA reduziert bei einer Co-Expression mit Trps1 die Hdac Aktivität auf von 109% auf 96% der u.t. Aktivität. n=3; *: Signifikanz ($p < 0,01$) gegen untransfizierte (u.t.) Zellen; **: Signifikanz ($p < 0,0001$), ##: Signifikanz ($p < 0,01$) und #: Signifikanz ($p < 0,05$) gegen Trps1 transfizierte Zellen. Signifikanzen mittels unpaarigem, zweiseitigen t-Test bestimmt. Die der Graphik zugrundeliegenden Werte siehe in Tabelle 9-5 im Anhang.

Die Hdac Aktivität der untransfizierten HEK293 EBNA Zellen wurde erneut gleich 1 und die übrigen gemessenen Aktivitäten hierzu in Relation gesetzt. Eine Trps1 Überexpression bewirkt eine signifikante Aktivitätssteigerung um 9 %. Die Transfektionen mit Hdac2 und Hdac4 siRNA sorgen jeweils für eine Senkung der Aktivität um etwa 6 %. Beide Aktivitätsreduktionen sind signifikant. Die Hdac6 siRNA hatte nur einen signifikanten Einfluss auf die Hdac Aktivität, wenn sie in Kombination mit dem Trps1 Überexpressionskonstrukt verwendet wurde. Ansonsten ist nur eine geringe nicht signifikante Reduktion auf 99% erkennbar. Wurde in den HEK293 EBNA Zellen das Trps1 Plasmid jeweils zusammen mit den

Hdac siRNAs (gegen 2, 4 und 6) transfiziert, konnte nur die Hdac4 siRNA die Aktivitätserhöhung durch die Trps1 Überexpression signifikant auf etwa 96 % senken. Die Aktivitätsreduktion der Hdac1 siRNA allein (94 %) konnte jedoch nicht erreicht werden. Die Hdac2 und Hdac6 siRNAs bewirkten nur eine leichte aber signifikante Verminderung der Aktivität auf 104 bzw. 106 % (berechnet zu untransfizierten HEK Zellen, aber in Relation zu HEK Zellen, die mit Trps1 (109 %) transfiziert wurden). Die Reduktion durch die Hdac4 siRNA ist wesentlich deutlicher, was auch in der Größe der Signifikanz-Werte (Trps1 + Hdac4 siRNA: 4,29526E-05; Trps1 + Hdac2 siRNA: 0,00269448 und Trps1 + Hdac6 siRNA: 0,02004045) absehbar ist. Die Reduktion der Hdac Aktivitäten bei den Doppeltransfektionen mit Trps1 und Hdac2 bzw. Hdac6 siRNA ist wohl auf die alleinige siRNA Wirkung zurückzuführen, da die Aktivitätserhöhung durch Trps1 nicht komplett (auf unter 100 %) revidiert werden kann (Abbildung 4-20).

Die Kontrolltransfektion mit unspezifischer siRNA verändert die Hdac Aktivität nicht, so dass diese bei etwa dem Wert (ca. 100 %) der untransfizierten Zellen liegt. Eine Transfektion mit dem Trps1 Plasmid und der unspezifischen siRNA ergibt eine Aktivität von 107 % und somit nur unsignifikant weniger als die Einzeltransfektion mit dem Trps1 Plasmid (Abbildung 4-20). Folglich scheint die Wirkung von Trps1 auf die Hdac Aktivität über Interaktionen mit Hdac1 (Abbildung 4-19) und Hdac4 (Abbildung 4-20), jedoch nicht über Interaktionen mit Hdac2 und Hdac6 zu funktionieren.

4.6. Hdacs und HATs beeinflussen die ATDC5 Differenzierung

Hdac Proteine haben bei der enchondralen Knochenentwicklung eine regulierende Funktion. Um zu testen ob eine Manipulation der Hdac Aktivität auch eine Veränderung von Differenzierungsprozessen bewirkt, wurde die Differenzierung der chondrogenen ATDC5 Zelllinie untersucht. ATDC5 Zellen können, vermittelt durch die Zugabe von 1% ITS (Insulin Transferrin Selenium), von einer mesenchymalen Vorläuferzelllinie in Chondrozyten differenziert werden. Diese Differenzierung läuft über einen Zeitraum von 28 Tagen und ist in der Formation von so genannten *Nodules* zu erkennen. Zellen die schneller und stärker differenzieren, bilden mehr und größere *Nodules*. Dabei wurde chemisch die Aktivität von Hdac und HAT (Histon Acetyl Transferase) Proteinen inhibiert. Als Inhibitor der HAT Funktion wurde die Substanz HAT Inhibitor II (HAT Inh. II) verwendet. Die Hdac Aktivität wurde mit

den chemischen Inhibitoren TSA (Trichostatin A) und NaB (Natrium Butyrat) herunter reguliert. Bei den beiden Hdac Inhibitoren ist zu beachten, dass TSA die Aktivität aller Hdacs, d.h. aller Hdacs der Klassen I und II, inhibiert, wobei NaB alle Hdacs außer Hdac6 inhibiert. Die ATDC5 Zellen wurden demnach zum Differenzieren mit ITS und zum Inhibieren der Hdac bzw. HAT Aktivität mit jeweils TSA, NaB und HAT Inh. II zusätzlich zum ITS behandelt. Als Negativkontrollen wurde Zellen ohne Zugabe der jeweiligen Substanzen, sowie ATDC5 Zellen, die nur mit Zugabe von ITS über 28 Tage kultiviert wurden analysiert.

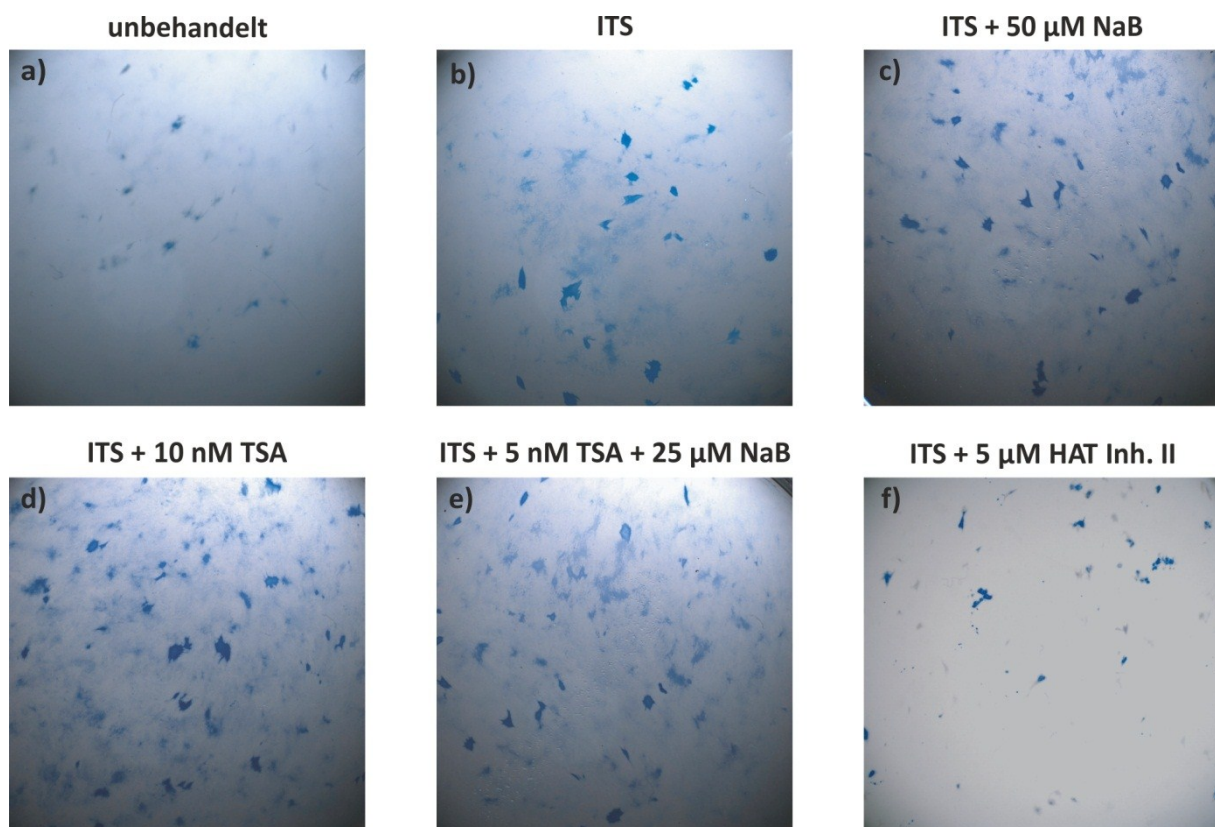


Abbildung 4-21: Die ATDC5 Differenzierung lässt sich durch Hdac und HAT Inhibitoren beeinflussen.

(a-f) Repräsentative Alzian Blau Färbung der über 28 Tage differenzierten und mit Hdac und HAT Inhibitoren behandelten ATDC5 Zellen. Zum Differenzieren wurde dem Medium 1% ITS zugesetzt. Hdac und HAT Inhibitoren sind in den in der Abbildung angegebenen Konzentrationen dem Medium zugesetzt worden. TSA und NaB Zugabe beschleunigen und verstärken, HAT Inh. II inhibiert die Differenzierung. TSA wirkt im Vergleich zu NaB effektiver.

Mit ITS behandelten ATDC5 Zellen (Abbildung 4-21b) zeigen mehr *Nodules* als unbehandelte Zellen (Abbildung 4-21a). Wurden die Zellen zusätzlich mit 50 µM NaB (Abbildung 4-21d) behandelt ist eine Steigerung der *Nodule*-Bildung zu erkennen. Noch mehr und größerer Chondrozyten *Nodules* erhält man nach einer Behandlung der ATDC5 Zellen mit ITS und 10 nM TSA (Abbildung 4-21c). Wurden die Zellen, zusätzlich zum ITS, jeweils mit der halben

NaB (25 μ M) und TSA (5 nM) Konzentration (Abbildung 4-21e) behandelt, ist die *Nodule* Anzahl und Größe zwischen der mit NaB- und TSA-behandelten ATDC5 Zellen. Eine Behandlung der Zellen mit ITS und 5 μ M des HAT Inh. II (Abbildung 4-21f) bewirkt eine Reduzierung der *Nodule* Anzahl und Größe unter das ITS-behandelte-Niveau (Abbildung 4-21b). Um die ATDC5 Differenzierung auch molekular nachzuweisen, wurde die Expression der Differenzierungsmarker Ihh (prähypertrophe Chondrozyten) und ColX (hypertrophe Chondrozyten) mittels RT-PCR untersucht. Die Expression beide Marker steigt ab Tag 14 bis zu Tag 28 an, womit eine Differenzierung auch molekular nachgewiesen ist (eigene nicht gezeigte Daten).

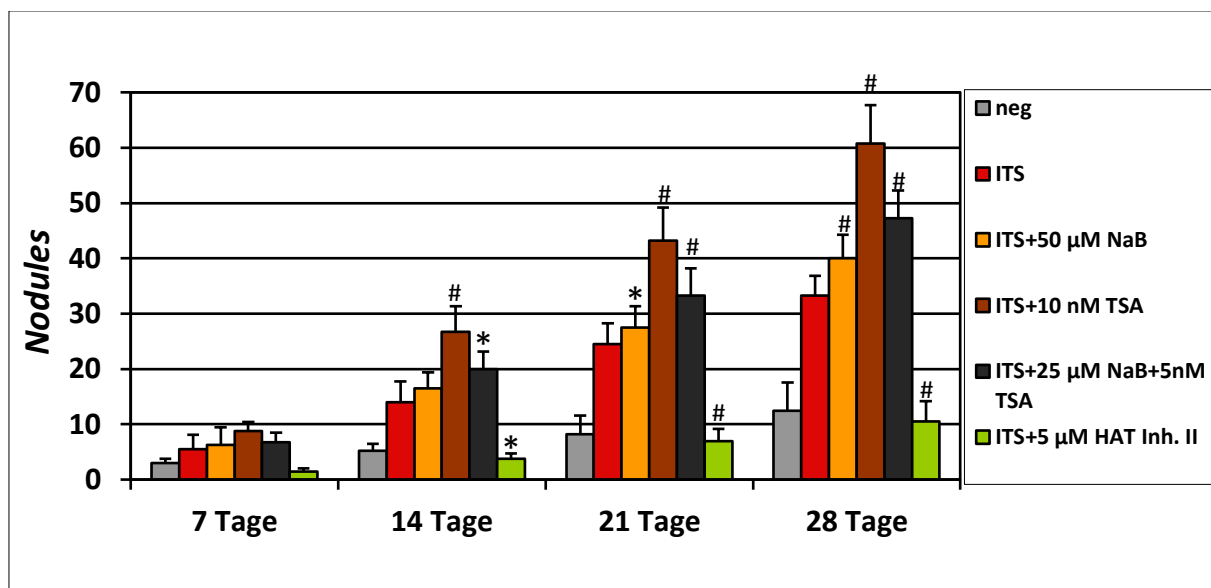


Abbildung 4-22: Hdac Inhibitoren verstärken, HAT Inhibitoren reduzieren die ATDC5 Differenzierung.

n=4; Signifikanz (*: $p < 0,05$ und #: $p < 0,01$) gegen ITS behandelte Zellen. Signifikanzen mittels zweiseitigem *students t-test* bestimmt. Die der Graphik zugrundeliegenden Werte siehe in Tabelle 9-6 im Anhang. Auswertung der *Nodule* Anzahl der über 28 Tage mit 1% ITS differenzierten und mit Hdac und HAT Inhibitoren behandelten ATDC5 Zellen. Die Inhibitorkonzentrationen sind in der Graphik angegeben. TSA erhöht ab 14 Tagen, NaB ab 21 Tagen der Behandlung die *Nodule* Zahl signifikant. Die halbkonzentrierte Verwendung beider Inhibitoren erhöht die Anzahl ab 14 Tagen. HAT Inh. II senkt die *Nodule* Zahl ab 14 Tagen Behandlung.

Vier unabhängigen ATDC5 Differenzierungs-Experimenten der *Nodule* Anzahl über vier Wochen wurde graphische und statistische ausgewertet (Abbildung 4-22). Dabei wurden alle sieben Tage die behandelten ATDC5 Zellen mit Alzian Blau angefärbt und die so angefärbten Chondrozyten *Nodules* ausgezählt. Hier ist deutlich zu erkennen, dass eine NaB Behandlung

(50 nM) zu den Zeitpunkten Tag 21 und Tag 28 der Differenzierung eine signifikante Erhöhung der *Nodule* Bildung auf 27,5 bzw. 40 *Nodules* zur ITS Kontrolle (24,5 bzw. 33,25) bewirkt. Die TSA Behandlung (10 nM) führte zu einer signifikanten Erhöhung ab Tag 14 der Differenzierung (26,75; 43,25 und 60,75 zu 14; 24,5 und 33,25). Ein ähnliches Ergebnis wurde mit der Doppelbehandlung [TSA (5 nM) + NaB (25 nM)] erreicht (20; 33,25 und 47,25), wobei die *Nodule* Anzahl geringer ist, als nach der TSA Behandlung alleine. Eine signifikante Reduktion der *Nodule* Bildung konnte ab Tag 14 nach der HAT Inh. II Behandlung ausgewertet werden (3,75; 7; 10,5).

Eine gesteigerte *Nodule* Bildung ist ein Hinweis für eine stärkere Differenzierung, wobei weniger *Nodules* ein Zeichen für eine schwächere Differenzierung der ATDC5 Zellen sind. Somit führt die Behandlung mit den Hdac Inhibitoren NaB und TSA zu einer erhöhten ATDC5 Differenzierung, wobei TSA stärker als NaB wirkt. Verwendet man beide Inhibitoren, in jeweils der halben Konzentration, liegt die Stärke der Differenzierung zwischen den einzeln behandelten Zellen. Der Unterschied der beiden Inhibitoren auf die Differenzierung könnte damit erklärt werden, dass TSA in Gegensatz zu NaB auch Hdac6 inhibiert. Der HAT Inh. II reduziert die ATDC5 Differenzierung. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass eine Reduktion der gesamten Hdac Aktivität eine beschleunigte und stärkere Differenzierung der ATDC5 Zellen bewirkt, wobei Hdac6 eine nicht zu vernachlässigende spezielle Rolle bei diesen Differenzierungsprozessen zugeordnet wird. Da die Hauptfunktion des cytoplasmatischen Hdac6 Proteins die Deacetylierung von Tublin ist, wurde untersucht, ob bei Differenzierungsprozessen in ATDC5 Zellen Unterschiede in der Tubulinacetylierung auftreten. Wäre dieses der Fall, könnte man erklären, warum die Inhibition von Hdac6 einen Effekt auf die ATDC5 Differenzierung hat.

Da die Tubulinacetylierung während der Differenzierung von ATDC5 Zellen relativ konstant ist (Abbildung 4-23), wird die stärkere Differenzierung, bei Hdac6 Inhibition, nicht von der Tubulindeacetylasefunktion stammen.

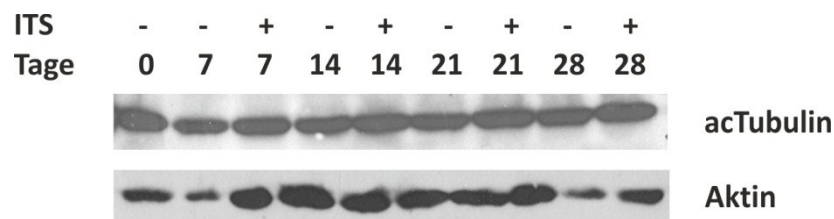


Abbildung 4-23: Acetyliertes Tubulin ist während der ATDC5 Differenzierung konstant exprimiert.

Westernblot und Detektion mit einem Antikörper gegen acetyliertes Tubulin und Aktin von über 28 Tagen differenzierten ATDC5 Zelllysaten. Acetyliertes Tubulin ist während der ATDC5 Differenzierung konstant exprimiert. Aktin dient als Ladekontrolle.

4.7. Die Histone H3 Acetylierung ändert sich während der ATDC5 Differenzierung

Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von Hdac und HAT Proteinen einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der ATDC5 Differenzierung haben. Hdac und HAT Proteine de- bzw. acetylieren Proteine, hier vor allem Histone. Es sollte deshalb der Acetylierungsgrad des Histons H3 am Lysin 9 (H3K9ac) während der Differenzierung (Zugabe von 1% ITS) von ATDC5 Zellen untersucht werden. Weiterhin wurden auch die H3K9 Acetylierung von ATDC5 Zellen analysiert, die mit den Hdac Inhibitoren TSA und NaB und mit dem HAT Inhibitor II während der Differenzierung behandelt wurden. Die DMSO Behandlung dient als Negativkontrolle zur HAT Inhibitor II Behandlung.

Differenzierende ATDC5 Zellen (nur ITS Behandlung) zeigen zu den Zeitpunkten Tag eins und sieben Tagen eine stark erhöhte H3K9 Acetylierung im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Ab 14 Tagen der Differenzierung sinkt der Acetylierungsgrad am Histon H3 stark, so dass nach 28 Tagen Differenzierung so gut wie keine Acetylierung mehr erkennbar ist. Die Behandlung mit den Hdac Inhibitoren TSA und NaB führt erwartungsgemäß nach einem und sieben Tagen zu einer Erhöhung der Acetylierung. Ab 14 Tagen der Differenzierung sinkt jedoch, trotz Hdac Inhibition, der Acetylierungsgehalt wieder, bis am Tag 28 kaum noch Acetylierung am H3K9 erkennbar ist. Die Behandlung mit HAT Inh. II im Vergleich zur DMSO Kontrolle zeigt in den ersten 21 Tagen der Differenzierung kaum eine Veränderung der H3K9 Acetylierung. Am 28sten Tag ist die Acetylierung aber deutlich reduziert (Abbildung 4-24a).

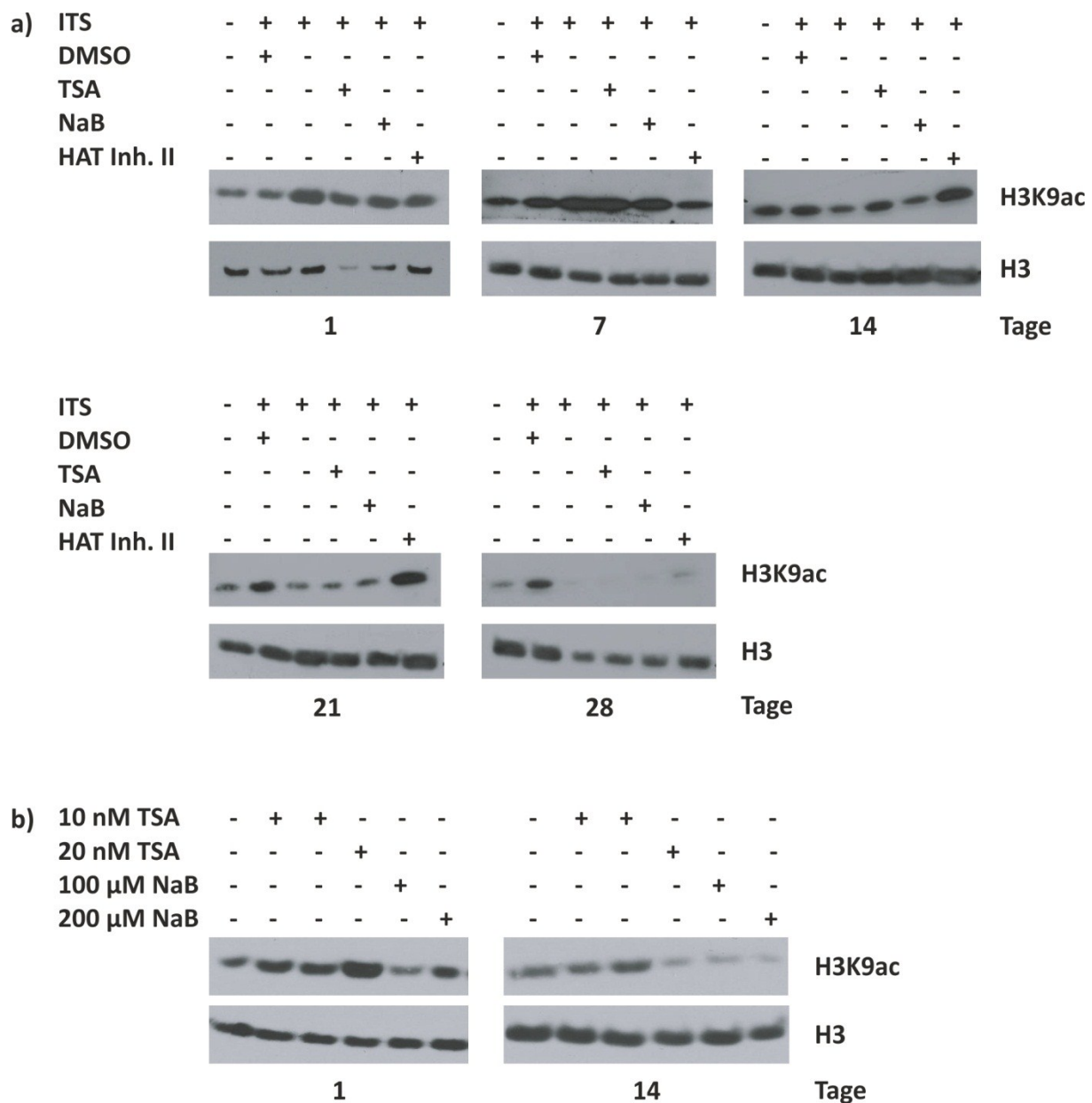


Abbildung 4-24: Die H3K9 Acetylierung ändert sich während der ATDC5 Differenzierung.

(a) H3K9ac und H3 (Ladekontrolle) Westernblots von differenzierten und mit Hdac und HAT Inhibitoren behandelten ATDC5 Zellen. Die ATDC5 Zellen wurden 28 Tage mit 1% ITS, sowie 10 nM TSA, 100 μ M NaB und 5 μ M HAT Inh. II behandelt und alle sieben Tage der H3K9 Acetylierungsgehalt mittels Westernblot bestimmt. ATDC5 Zellen die schnell differenzieren (ITS, TSA und NaB behandelte Zellen) zeigen bis sieben Tagen eine hohe Acetylierung, die bis zu 28 Tagen reduziert wird. **(b)** H3K9ac und H3 (Ladekontrolle) Westernblot von ATDC5 Zelllysaten. Die Zellen wurden 14 Tage mit den Hdac Inhibitoren TSA und NaB behandelt. ATDC5 Zellen verlieren die Sensibilität für die Inhibitoren während der Behandlung.

Da ab dem 14ten Tag der Differenzierung die Acetylierung am H3K9 trotz Hdac Inhibitor Behandlung sinkt, wurde untersucht, ob die Inhibitoren ihre Hdac inhibierende Wirkung auch nach längerer Behandlung behalten, oder ob die direkte Wirkung auf die H3K9 Acetylierung nachlässt. Dafür wurden ATDC5 Zellen über 14 Tagen mit unterschiedlichen

Konzentrationen der Hdac Inhibitoren TSA und NaB behandelt und der Acetylierungsgehalt nach einem und 14 Tagen mittels Westernblot untersucht.

Nach einem Tag Behandlung steigt die H3K9 Acetylierung der mit 10 und 20 nM TSA und mit 200 μ M NaB behandelten ATDC5 Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen deutlich an. 100 μ M NaB Behandlung hat nur eine geringe Steigerung zur Folge. Nach 14 Tagen erkennt man nur noch eine leichte Steigerung der H3K9 Acetylierung durch 10 nM TSA Behandlung, wohingegen nach einer Behandlung mit 20 nM TSA, 100 und 200 μ M NaB das H3K9 Acetylierungsniveau im Vergleich zu unbehandelten Zellen sogar noch herabgesenkt ist (Abbildung 4-24b). Die Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass die Hdac Inhibitoren zu Beginn der Behandlung auf die H3K9 Acetylierung wie erwartet wirken und die Acetylierung steigern. Im Verlauf der Behandlung verlieren die Inhibitoren aber ihre Wirkung auf die H3K9 Acetylierung. Die gesenkte Acetylierung spricht dafür, dass die Inhibitoren aber einen anderen Effekt auf die ATDC5 Zellen haben, als nur eine Histon Deacetylierungsfunktion. ATDC5 Zellen, die differenzieren, zeigen bis zum Zeitpunkt von sieben Tage eine deutlich gesteigerte H3K9 Acetylierung, die dann kontinuierlich reduziert wird. Ein ähnliches Verhalten sieht man bei ATDC5 Zellen, die zusätzlich mit Hdac Inhibitoren behandelt werden, obwohl eine gesteigerte Acetylierung zu erwarten wäre. Es konnte gezeigt werden, dass Hdac Inhibitoren die ATDC5 Differenzierung beschleunigen (siehe 4.6).

4.8. Trps1 interagiert in unterschiedlichen Proteinkomplexen

Es wurde gezeigt dass Trps1 mit unterschiedlichen Hdac Proteinen interagiert (siehe 4.2.1 und 4.2.2). Es stellte sich die Frage, ob Trps1 mit diesen Hdac Proteinen in einem großen oder mehreren kleinen Komplexen interagiert. Um dieses zu untersuchen, wurde eine Gelfiltration mit einem HEK293 EBNA Zelllysate durchgeführt. Mittels einer Gelfiltration lassen sich Proteine und Proteinkomplexe anhand der Größe separieren. Die Fraktionen der Gelfiltration enthalten demnach Proteine und Komplexe einer bestimmten Größe. Diesen größenspezifischen Fraktionen wurde dann mittels Westernblot bezüglich eines Vorkommens von Trps1, Hdac1, Hdac4 und Hdac6 analysiert. Anhand der bekannten Proteingrößen lassen sich dann Rückschlüsse auf die potentielle Zusammensetzung der Proteinkomplexe ziehen.

Trps1 konnte in den Fraktionen der Größe zwischen 307 und 687 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 4-25). Trps1 hat eine Größe von etwa 170 kDa. Somit liegt Trps1 nicht als einzeln vorkommendes Protein vor. Es muss im Komplex mit einem oder mehreren Proteinen ab etwa 130 kDa bis etwa 510 kDa vorkommen.

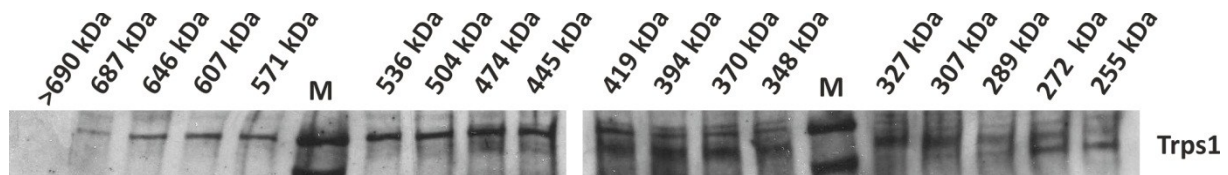


Abbildung 4-25: Trps1 kommt in Proteinkomplexen zwischen 307 und 687 kDa vor.

Trps1 Westernblot nach einer analytischen Gelfiltration. Trps1 Proteine sind im Bereich zwischen 307 und 687 kDa nachzuweisen. M=Proteinmarker.

Hdac4 kommt in Fraktionen der Größe zwischen 146 und 687 kDa vor (Abbildung 4-26). Da Hdac4 etwa 140 kDa groß ist, liegt es somit sowohl als monomer, als auch im Komplex mit anderen Proteinen vor. Hdac4 kommt demnach auch in Fraktionen zusammen mit Trps1 vor.

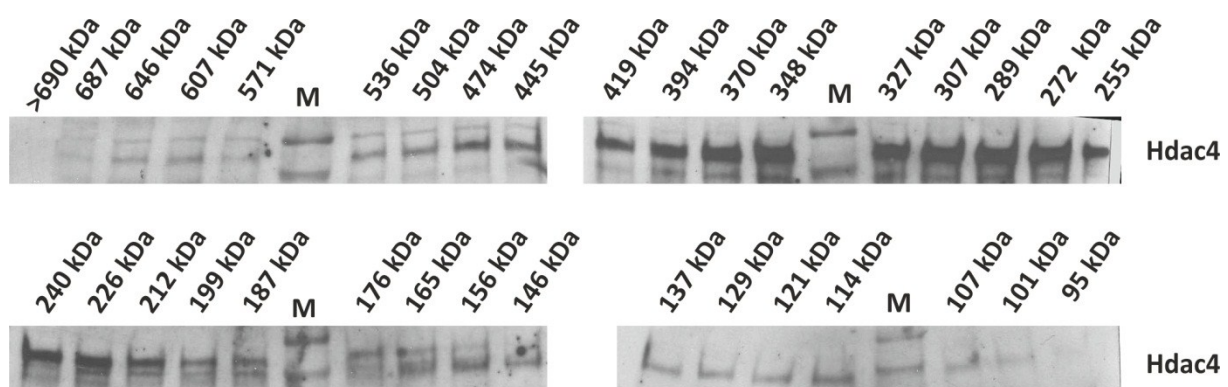


Abbildung 4-26: Hdac4 tritt in Proteinkomplexen zwischen 146 und 687 kDa auf.

Hdac4 Westernblot nach einer analytischen Gelfiltration. Hdac4 Proteine sind im Bereich zwischen 146 und 687 kDa nachzuweisen. M=Proteinmarker.

Hdac1 wurde in den Fraktionen der Größe zwischen 272 und 646 kDa und zwischen 66 und 79 kDa nachgewiesen (Abbildung 4-27). Hdac1 hat eine Größe von etwa 55 kDa. Somit kommt Hdac1 entweder als einzelnes Protein oder im Komplex mit Proteinen ab etwa 200 bis 590 kDa vor. Hdac1 ist in denselben Fraktionen wie Trps1 und Hdac4 zu finden.

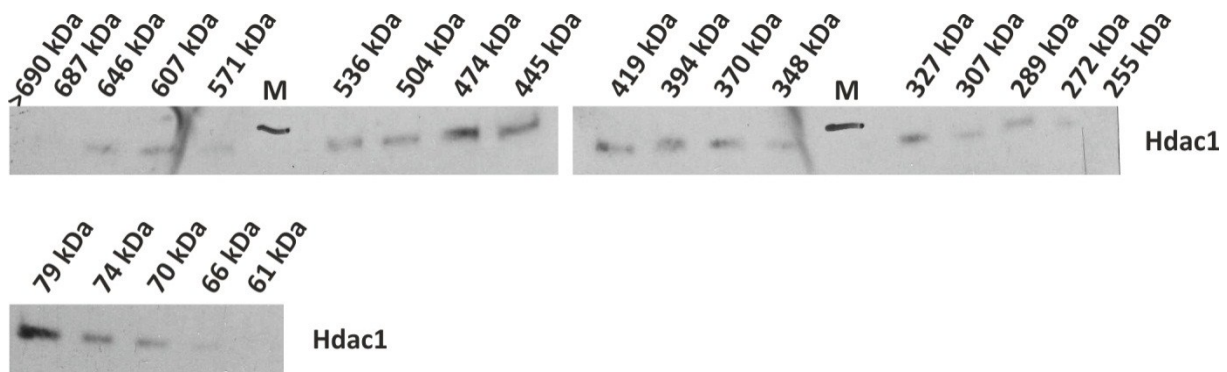


Abbildung 4-27: Hdac1 kommt in Komplexen zwischen 272 und 646 kDa und 66 und 79 kDa vor.

Hdac1 Westernblot nach einer analytischen Gelfiltration. Hdac1 Proteine sind im Bereich zwischen 272 und 646 kDa und zwischen 66 und 79 kDa nachzuweisen. M=Proteinmarker.

Hdac6 kann in den Fraktionen der Größe 176 bis 687 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 4-28). Hdac6 hat eine Größe von etwa 160 kDa und liegt somit als monomer und in Komplexen mit Proteinen bis zur Größe von etwa 510 kDa vor. Es gibt ebenfalls Überschneidungen in den Fraktionen mit Trps1, Hdac4 und Hdac1.

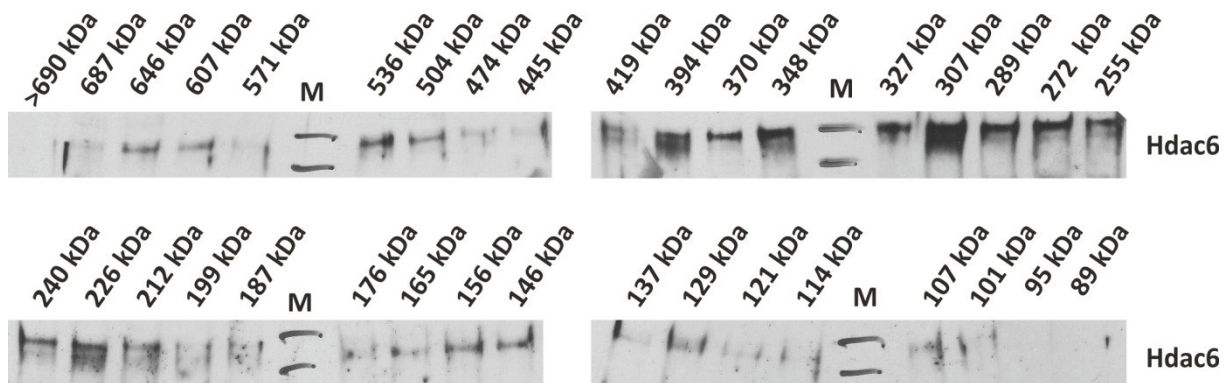


Abbildung 4-28: Hdac6 tritt im Komplexen zwischen 176 und 687 kDa auf.

Hdac6 Westernblot nach einer analytischen Gelfiltration. Hdac6 Proteine sind im Bereich zwischen 176 und 687 kDa nachzuweisen. M=Proteinmarker.

Als Kontrolle wurden die Fraktionen auf das Vorkommen von Aktin mittels Westernblot analysiert (Abbildung 4-29). Aktin ist in Fraktionen zwischen 48 und 74 kDa zu detektieren und weist keine Überschneidungen mit Trps1, Hdac4 und Hdac6 auf.

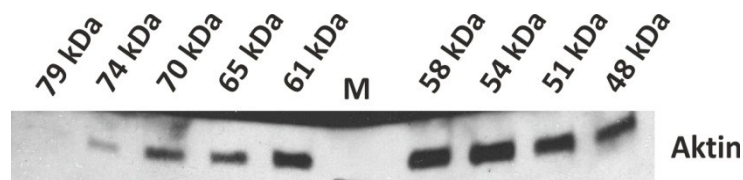


Abbildung 4-29: Aktin ist in Proteinkomplexen zwischen 48 und 74 kDa nachzuweisen.

Aktin Westernblot nach einer analytischen Gelfiltration. Aktin Proteine sind im Bereich zwischen 48 und 74 kDa nachzuweisen. M=Proteinmarker.

Rechnerisch ist es nun möglich, theoretische Trps1 Komplexe verschiedener Größe zu ermitteln. Trps1 könnte z.B. zusammen mit Hdac1, Hdac4 und Hdac6 einen etwa 525 kDa großen Komplex, oder nur mit Hdac4 den kleinsten vorkommenden Trps1 Komplex von etwa 310 kDa bilden.

4.9. Trps1 interagiert mit weiteren Transkriptionsfaktoren und Hitzeschock Proteinen (Hsp)

Trps1 interagiert mit mehreren Transkriptionsfaktoren (z.B. Runx2) und Chromatinmodifikatoren (z.B. Hdac1 und Hdac4) auf Proteinebene. Es kann vermutet werden, dass Trps1, als eine Art „Adapterprotein“, in größeren Transkriptionskomplexen eine verbindende und modifizierende Funktion hat. Sollte Trps1 in größeren Transkriptionskomplexen vorkommen und eine Funktion ausüben, müsste Trps1 auch mit weiteren Transkriptionsfaktoren oder Chromatinmodifikatoren interagieren und somit auch präzipitieren. Um dieses zu untersuchen, wurde nach weiteren Interaktionsproteinen mittels Co-IP gesucht. Dafür wurden Co-IPs in ATDC5 Zelllysaten, gegen endogenes Trps1, und in HEK293 EBNA Zelllysaten, die mit einem Trps1 Konstrukt (pFlag-Trps1) transfiziert wurden, gegen exogenes Trps1, durchgeführt. Die Co-Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie angefärbt, die dann erkennbaren Banden ausgeschnitten und per *Peptide-Mass-Fingerprint* (PMF) im Zentralen Analytik Labor der Universität Köln massenspektrometrisch identifiziert.

4.9.1. Co-IP mit überexprimiertem Trps1

Mittels SDS-PAGE (Abbildung 4-30) wurden die Lysate nach einer Co-IP gegen exogenes Trps1 in HEK293 EBNA Zellen aufgetrennt. Die in der Co-IP Spur angefärbten Banden wurden mittels *PMF* identifiziert. Die Co-IP und *PMF*-Analyse wurde zweimal durchgeführt. Tabelle 4-1 und Tabelle 4-2 zeigen die identifizierten Proteine und somit mögliche Trps1 Interaktionsproteine. Interessant für weitere Interaktionsstudien sind die nukleären Proteine SP110 und SUPT6H, die in Transkriptionskomplexen mit Trps1 vorkommen könnten, sowie die Proteine der Hitzeschock Gruppe Hsp70 und Hsp90. Die Detektion von Trps1 mittels *PMF* ist eine gute Positivkontrolle, die zeigt, dass die Trps1 Immunpräzipitation funktioniert hat.

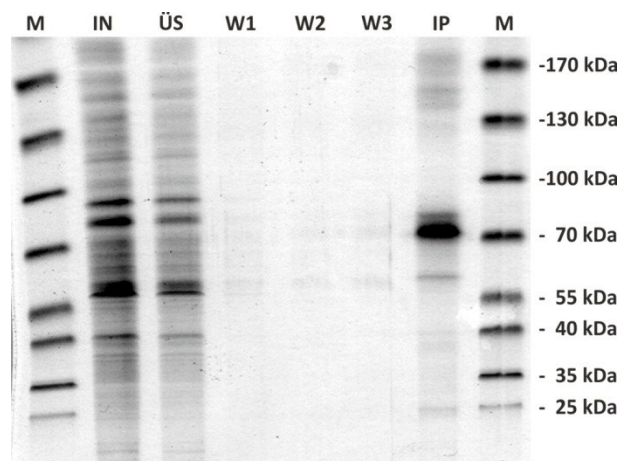


Abbildung 4-30: Potentielle Trps1 Interaktionsproteine.

Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Co-IP gegen überexprimiertes Trps1 in HEK293 EBNA Zellen. In der IP Spur sind einige potentielle Trps1 Interaktionsproteine zu erkennen. M=Proteinmarker, IN=Input, ÜS=Überstand, W1-3: Waschschritte 1-3, IP: Co-IP.

Tabelle 4-1: *Peptide Mass Fingerprint* nach Co-IP mit überexprimiertem Trps1 (1. Co-IP)

Bande	Bandengröße	PMF
1	25 KD	Immunoglobulin Gamma, schwere Kette, Konstante Region (Fragment) [<i>Oryctolagus cuniculus</i>]
2	30 KD	Kette A, Struktur eines löslichen sekretierten Chemokin Inhibitors aus einem Kuhpocken Virus
3	32 KD	SP110 Nukleär Körper Protein [<i>Homo sapiens</i>]; TNF Rezeptor-Assoziiertes Protein 1 Variante [<i>Homo sapiens</i>]
4	35 KD	Hypothetisch LOC51149, Isoform CRA_b [<i>Homo sapiens</i>]
5	50 KD	Immunoglobulin Gamma 1, konstante Region [<i>Oryctolagus cuniculus</i>]
6	60 KD	Keratin 1 [<i>Homo sapiens</i>]
7	100 KD	Hsp90 Beta1 [<i>Homo sapiens</i>]
8	110 KD	Golgi Autoantigen, Golgin Unterfamilie a, 3, Isoform CRA_d [<i>Homo sapiens</i>]; Spermien-Assoziiertes Antigen 1, Isoform CRA_b [<i>Homo sapiens</i>]
9	170 KD	TRPS1, Zink Finger Transkriptionsfaktor 1 [<i>Mus musculus</i>]

Tabelle 4-2: *Peptide Mass Fingerprint* nach Co-IP mit überexprimiertem Trps1 (2. Co-IP)

Bande	Bandengröße	PMF
1	50 KD	Immunoglobulin Gamma 1, konstante Region [<i>Oryctolagus cuniculus</i>]
2	60 KD	Hsp70 1A, ATPase N-Terminale Domäne [<i>Homo sapiens</i>]
3	70 KD	SUPT6H Protein [<i>Homo sapiens</i>]

4.9.2. Co-IP mit endogenem Trps1

Mittels SDS-PAGE (Abbildung 4-31) wurden die Lysate nach einer Co-IP gegen endogenes Trps1 in ATDC5 Zellen aufgetrennt. Die angefärbten Banden der Co-IP Spur wurden mittels *PMF* analysiert.

Die identifizierten Proteine sind in Tabelle 4-3 aufgelistet. Mögliche Trps1 Interaktoren sind erneut Proteine der Hsp Gruppe wie der Aktivator des Hsp90 und DnaJ. Weiterhin wurden die putative ATP-abhängige RNA Helikase P110, die eine Rolle im Spleißosom hat, sowie der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 3 gefunden. Gerade die Hitzeschock Proteine und

Proteine, die Funktionen in der Transkription haben, werden weiter auf eine mögliche Trps1 Interaktion untersucht.

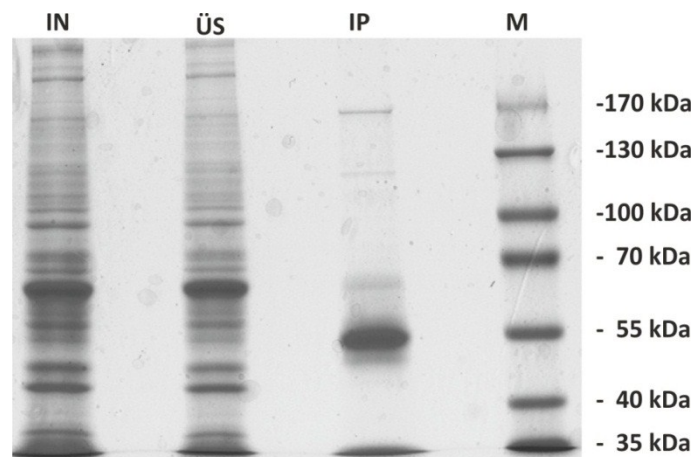


Abbildung 4-31: Potentielle Trps1 Interaktoren.

Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Co-IP gegen endogenes Trps1 in ATDC5 Zellen. In der IP Spur sind einige potentielle Trps1 Interaktionsproteine zu erkennen. M=Proteinmarker, IN=Input, ÜS=Überstand, IP: Co-IP.

Tabelle 4-3: Peptide Mass Fingerprint nach Co-IP mit endogenem TRPS1

Bande	Bandengröße	PMF
1	40	Aktin, Zytoplasmatisch [<i>Mus musculus</i>]; Aktivator des 90 kDa Hitzeschock Proteins (Hsp90) ATPase Homolog 2 [<i>Mus musculus</i>]
2	45	DnaJ homologe Unterfamilie A,3, mitochondrial [<i>Mus musculus</i>]; Glyoxalase Domänen-beinhaltendes Protein 4 [<i>Mus musculus</i>]
3	70	Putative ATP-abhängige RNA Helikase P110[<i>Mus musculus</i>]
4	75	Tudor Domäne-beinhaltendes Protein 12 [<i>Mus musculus</i>]; Putative ATP-abhängige RNA Helikase P110[<i>Mus musculus</i>]
5	110	Eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 3, Untereinheit B [<i>Mus musculus</i>]

4.10. Trps1 interagiert mit Hsp90

Als erster Kandidat aus der Trps1 Interaktionsanalyse wurde eine Proteininteraktion von Trps1 mit Hsp90 durch Co-Immunpräzipitation mit dem Trps1 spezifischen Antikörper durchgeführt. Da es bekannt ist, dass HSP90 zusammen mit Hdac6 die zelluläre Lokalisation von Transkriptionsfaktoren regulieren kann, wurde vermutet, dass diese beiden Proteine durch eine gemeinsame Interaktion mit Trps1 auch die Lokalisation von Trps1 während der Differenzierung regulieren können. Deshalb wurde untersucht, ob Trps1 und Hsp90 während der ATDC5 Differenzierung unterschiedlich interagieren. Dafür wurden ATDC5 Zellen einmal proliferierend und einmal unter differenzierenden Bedingungen (+1% ITS) kultiviert. Anschließend wurde in den jeweiligen Lysaten Trps1 Co-IPs durchgeführt und das Vorkommen von Trps1 und Hsp90 im Präzipitat analysiert.

Es ist deutlich zu erkennen, dass in proliferierenden Zellen mehr Hsp90 Protein in der Präzipitationsspur nachzuweisen ist, als in differenzierten ATDC5 Zellen (Abbildung 4-32). Trps1 und Hsp90 interagieren folglich auf Proteinebene, wobei die Interaktion in proliferierenden ATDC5 Zellen stärker ist. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Interaktion beider Proteine während der Differenzierung unterschiedlich reguliert ist und je nach Differenzierungsstatus der Zellen unterschiedlich stark auftritt.

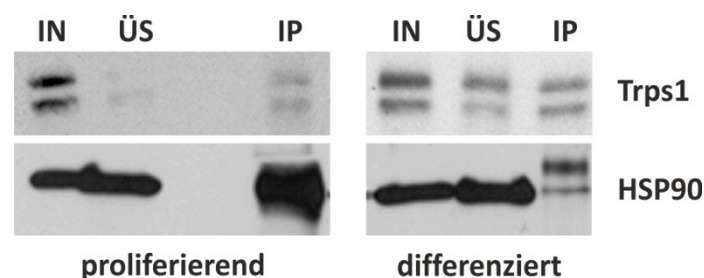


Abbildung 4-32: Trps1 und HSP90 interagieren verstärkt in proliferierenden ATDC5 Zellen.

Trps1 und Hsp90 Westernblot nach einer Trps1 Co-IP in Lysaten aus proliferierenden und differenzierten ATDC5 Zellen. Sowohl Trps1, als auch Hsp90 sind in der Präzipitationsspur nachzuweisen. In proliferierenden Zellen kann mehr Hsp90 Protein co-präzipitiert werden. N=Input, ÜS=Überstand, IP=Co-IP.

5. Diskussion

5.1. Trps1 interagiert mit Histondeacetylasen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Trps1 und die Histondeacetylasen Hdac4 und Hdac6 in parallelen Regionen während der Chondrozyten Differenzierung und enchondralen Ossifikation in den Vorderextremitäten von Mäusen exprimiert werden. In proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten kommen alle drei Proteine vor. Aufgrund der parallelen Expression *in vivo* ist eine Interaktion und gemeinsame Regulation von Differenzierungsprozessen in Chondrozyten möglich. Eine gemeinsame Expression konnte auch in der chondrogenen ATDC5 Zelllinie nachgewiesen werden, die für Interaktionsuntersuchungen verwendet wurde. Diese Analysen haben gezeigt, dass Trps1 mit Hdac4 und Hdac6 interagiert. Weiterhin wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass Trps1 auch mit Hdac1, aber nicht mit Hdac2 interagiert.

Bisherige Studien zeigten, dass Trps1 die Chondrozyten Proliferation und hypertrophe Differenzierung reguliert (Suemoto et al., 2007; Wuelling et al., 2009). Hdac4 reguliert ebenfalls die Chondrozyten Differenzierung durch eine Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren Runx2 und Mef2, die die Hauptregulatoren der Differenzierung sind, sowie mit dem Co-Repressor Zpf521 (Arnold et al., 2007; Correa et al., 2010; Vega et al., 2004). Hdac1 reguliert die Osteoblasten Differenzierung durch eine Interaktion mit und Modifikation von Runx2, wodurch die transkriptionelle Aktivität von Runx2 reduziert wird (Lee et al., 2006). Hdac2 hat keinen Effekt auf Chondrozyten oder Osteoblasten Differenzierungsprozesse (Trivedi et al., 2007). Hdac6 ist in differenzierten Osteoblasten exprimiert und reprimiert durch die Interaktion mit Runx2 die Genexpression (Jensen et al., 2009; Westendorf et al., 2002). Hdac6 Verlust führt zu einer leichten Reduktion in der trabekulären Knochendichte (Zhang et al., 2008). Hdac6 ist nur in sehr geringem Maße im Nukleus vorzufinden und hat hauptsächlich eine Zytoplasmatische Tubulindeacetylase Funktion.

Da Trps1 und Hdac4 ähnliche Schritte in der Chondrozyten Differenzierung regulieren und in den gleichen Zellen exprimiert werden, kann angenommen werden, dass sie zusammen eine Komplex bilden, der die Differenzierungsprozesse kontrolliert. Runx2 kann als Transkriptionsfaktor mit verschiedenen Hdac Proteinen in unterschiedlichen Zellarten interagieren und wird durch diese inhibiert (Jeon et al., 2006; Kang et al., 2005; Schroeder et

al., 2004; Vega et al., 2004; Westendorf, 2006; Westendorf et al., 2002). Durch Trps1, das sowohl mit Runx2 (Napierala et al., 2008), als auch mit Hdacs interagieren kann, könnte die Interaktion zwischen Hdacs und Runx2 zelltypspezifisch vermittelt bzw. feinreguliert werden. Die Aktivität von Hdac4 wird unter anderem über einen Export aus dem Nukleus reguliert (Vega et al., 2004). Trps1 kann auch sowohl im Nukleus, als auch im Zytoplasma vorliegen, wobei Trps1 in proliferierenden ATDC5 Zellen einen hohen Zytoplasmatischen Anteil hat und in differenzierenden ATDC5 Zellen hauptsächlich nukleär vorliegt (eigene nicht gezeigte Daten). Eine Interaktion der beiden Proteine findet hauptsächlich im Nukleus von differenzierenden bzw. bereits differenzierten Chondrozyten statt, so dass diese Interaktion wohl eine nukleäre Funktion bei der Differenzierung hat. Hdac4 als Histon- und allgemeine Proteindeacetylase kann im Nukleus Histone und z.B. Transkriptionsfaktoren wie Runx2 deacetylieren (Jeon et al., 2006; Kang et al., 2005). Die Rolle von Trps1 könnte eine Modulierung bzw. eine Feintuning der Deacetylaseaktivität während der Differenzierung sein. Dabei könnte Trps1 zum einen die Deacetylierung anderer Transkriptionsfaktoren, wie Runx2, und zum anderen die Deacetylierung von Promotoren, wie die des Runx2 Promotors, regulieren.

Die Interaktion von Trps1 und Hdac6 kann funktionell entweder auch über Runx2 Differenzierungsprozesse regulieren, oder aber die Interaktion hat eine eher Zytoplasmatische Funktion und dient der Relokalisation von Trps1 vom Zytoplasma in den Nukleus (siehe 5.7).

5.2. Trps1 erhöht die Hdac Aktivität

Eine Veränderung der Trps1 Proteinmenge bzw. der Aktivität resultiert, sowohl in Zellkulturen, als auch *in vivo*, zu einer Änderung der globalen H3K9 und H3K18 Acetylierung. Eine Überexpression von Trps1 resultiert in einer geringeren Acetylierung. Der Verlust von aktivem Trps1 in *Trps1*^{-/-} Mäusen führt zu einem höheren globalen H3K9 und H3K18 Acetylierungsgehalt, welches entweder aus einer höheren HAT oder geringerer Hdac Aktivität resultieren kann (Furumatsu and Asahara, 2010; Furumatsu and Ozaki, 2010; Peserico and Simone, 2011). Aufgrund der Interaktion von Trps1 mit mehreren Hdac Proteinen und der Erhöhung der *in vitro* Hdac Aktivität durch Trps1, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Histonacetylierungsänderung über eine Modulation der Hdac und nicht der HAT Aktivität

bewirkt wird. Diese Modulation kann mit zwei prinzipiellen Mechanismen erklärt werden. Zum einen könnte Trps1, als eine Art Adapterprotein Hdac Proteine zum Chromatin bringen, so dass diese verstärkt Histone deacetylieren, was zu einer Reduktion der H3K9 und H3K18 Acetylierung führt. Zum anderen ist es möglich, dass über die Trps1-Hdac Interaktion die katalytische Aktivität von Hdac Proteinen gesteigert wird, so dass ebenfalls die Histonacetylierung reduziert wird. Mittels eines Hdac Aktivitätstest konnte nachgewiesen werden, dass Trps1 die Hdac Aktivität erhöht, was dafür spricht, dass Trps1 über eine Interaktion mit Hdacs die katalytische Aktivität erhöhen kann. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass Trps1 ebenfalls die Funktion eines Adapterproteins hat, und Hdacs an Zielhistone führen kann. Hdac Proteine haben selbst keine DNA-Bindende Aktivität und sind auf zell- und genspezifische Adapterproteine angewiesen (Furumatsu and Ozaki, 2010). Trps1 könnte diese Funktion in der Chondrogenese erfüllen. Wie Trps1 die katalytische Hdac Aktivität erhöhen kann und ob Trps1 als Hdac Adapterprotein in der Chondrogenese agiert, gilt es aber noch zu untersuchen.

Da bisher gezeigt werden konnte, dass Trps1 mit Hdac1, 4 und 6 interagieren kann, stellte sich die Frage, durch welche Trps1-Hdac Interaktion die Erhöhung der *in vitro* Hdac Aktivität hervorgerufen wird. Durch siRNA basierte spezifische Herunterregulation von einzelnen Hdacs konnten gezeigt werden, dass hauptsächlich die Interaktion von Trps1 mit Hdac1 und Hdac4 für die *in vitro* Hdac Aktivitätserhöhung verantwortlich ist. Für Hdac4 (Arnold et al., 2007; Vega et al., 2004) und Hdac1 (Lee et al., 2006) wurden wichtige Funktionen während der Chondrozyten bzw. Osteoblasten Differenzierung nachgewiesen. Es gilt nun zu klären, ob diese Funktionen im Zusammenspiel mit Trps1 ausgeführt werden. Trps1 könnte die inhibierende Aktivität von Hdac4 auf Runx2 in proliferierenden Chondrozyten modulieren. In Osteoblasten ist eine Modulation von Hdac1 und somit die inhibierende Wirkung auf die transkriptionelle Aktivität von Runx2 und auf die reduzierte Expression von Runx2 Zielgene ebenfalls durch Trps1 möglich.

5.3. Die reduzierte Hdac Aktivität in *Trps1*^{-/-} Mäusen resultiert in Mitosedefekten

Aufbauend auf den in dieser Arbeit demonstrierten Daten hat sich in parallelen Studien gezeigt, dass das Fehlen von aktivem Trps1 Protein zu einer Anreicherung mitotischer

Chondrozyten, zurückhängender Chromosomen, duplizierter Zentriolen und Aneuploidien führt (Wuelling et al. in Begutachtung). Es kann vermutet werden, dass Trps1 die Mitose im Zusammenspiel mit Hdac Proteinen reguliert. Es wurde gezeigt, dass Trps1 mit unterschiedlichen Hdacs interagiert und deren katalytische Aktivität *in vitro* und *in vivo* erhöht. Das Fehlen von intaktem Trps1 in *Trps1*^{-/-} Chondrozyten führt zu einer erhöhten H3K9 und H3K18 Acetylierung und das speziell während der G2/M-Phase (Wuelling et al. in Begutachtung).

Die Deacetylierung von Histonen in der Prometaphase ist ein essentieller Schritt für die Kondensation des Chromatins, und somit der Chromosomen, während der Mitose (Cimini et al., 2003; Robbins et al., 2005; Valls et al., 2005). Aufgrund einer Hyperacetylierung wird der Eintritt in die Metaphase inhibiert, so dass mehr Chondrozyten in der Prometaphase vorliegen. Hdac Proteine sind dafür bekannt, dass sie unterschiedliche Schritte der Mitose regulieren, wobei die molekularen Mechanismen bisher noch nicht exakt aufgeschlüsselt sind (Gabrielli et al., 2011; Kruhlak et al., 2001; Park et al., 2011). Hyperacetyliertes Chromatin interferiert mit der Kondensation der Chromosomen und führt zur Aktivierung des Spindel-Anheftungs-Kontrollpunktes und zu einem Arrest in der Prometaphase der Mitose (Gabrielli et al., 2011; Shin et al., 2003; Zhang et al., 2010). Eine Inhibierung der Hdac Protein Aktivität führt während der Mitose zu einer Hyperacetylierung von Histonen unter anderem an den Positionen H3K4 (Eot-Houllier et al., 2008) und H3K9 (Park et al., 2011) und somit weniger kondensiertem Chromatin in der Prometaphase.

Eine Inhibition von Hdacs bewirkt eine Hyperacetylierung des p21 Promotors, was somit zur Expression von p21 und zum G2/M Zellzyklus Arrest führt (Clarke et al., 2011; Ocker and Schneider-Stock, 2007; Richon et al., 2000). Weiterhin ist die Deacetylierung des Histons H3 am Lysin 9 in centromerischen Bereichen essentiell für die dreifache Methylierung an derselben Position (H3K9me3). Diese Methylierung ermöglicht die Anheftung des Heterochromatin-Binde-Proteins 1 (HP1) an Centromere (Li et al., 2006; Park et al., 2011) und somit eine Rekrutierung von chromosomalen Passagier Komplex (*chromosomal passenger complex*, CPC) Komponenten (Heit et al., 2009; Xin et al., 2004), die die Bildung des Kinetochors und die Anheftung der Spindel regulieren.

Weiterhin ist es auch möglich, dass eine Inhibition von Hdac Proteinen die korrekte Ausrichtung der Mikrotubuli während der Mitose stört (Gabrielli et al., 2011). Einen ähnlichen Phänotyp wie in *Trps1*^{-/-} Mutanten wurde in Fibroblasten beschrieben, denen

Hdac3 fehlt (Bhaskara et al., 2008; Ishii et al., 2008). Bhaskara et al. postulieren, aufgrund eines Hdac3 siRNA *Knockdowns* und Hdac Inhibitor Experimenten, eine Funktion von Hdac3 in der Spindelbildung und Chromosomenanordnung. Weiterhin konnte eine erhöhte Anzahl an mitotischen Zellen und eine stärkere Hdac3 abhängige H3K4 Acetylierung nachgewiesen werden, die für die Rekrutierung der AuroraB Kinase ans Chromatin und einer Histon Phosphorylierung verantwortlich sein soll (Eot-Houllier et al., 2008). Ishii et al. konnten eine Hdac3 Rolle in der Assemblierung und Funktion von Kinetochorproteinen nachweisen (Ishii et al., 2008).

Es ist bekannt, dass die mit Trps1 interagierenden Hdacs 1, 4 und 6 unterschiedliche Funktionen während des Zellzyklus ausführen. Hdac1 aktiviert den Übergang von der G1- zur S-Phase, wobei die Rolle der Histondeacetylierung bisher nicht untersucht wurde. Das Fehlen von Hdac4 zusammen mit p53 resultiert in Problemen der Chromosomen Verteilung und Stabilität, wobei Hdac4 defiziente Fibroblasten keinen Zellzyklus Defekt aufweisen (Cadot et al., 2009).

Die Inhibition von Hdac6 bewirkt eine erhöhte Tubulinacetylierung, die wiederum die Mikrotubulidynamik senkt und somit zum Zellzyklus Arrest führt (Boyault et al., 2007; Clarke et al., 2011; Haggarty et al., 2003; Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002).

Trps1 könnte im Zusammenspiel mit Hdac Proteinen den Übergang von der Prometaphase zur Metaphase regulieren. Die Mitoseanomalien in *Trps1*^{-/-} Mäuse können mit einem möglichen Kondensationsdefekt erklärt werden, der durch eine verminderte Hdac1 und Hdac4 Aktivität am Histon H3 hervorgerufen wird (Abbildung 5-1). Zusammenfassend kann vermutet werden, dass Trps1 als zelltypspezifisches Adapterprotein mit unterschiedlichen Hdacs interagieren kann und nachweislich die Hdac Aktivität erhöht. Dieses führt zu deacetyliertem Histon H3 während der Prometaphase und kompaktem Chromatin. Dieses bewirkt den korrekten Ablauf der Mitose. Diese Hypothese wird dadurch bestätigt, dass in *Trps1*^{-/-} Mäusen das Histon H3 hyperacetyliert vorliegt, es eine Anhäufung von Zellen in der G2/M-Phase gibt und die Zellen Chromosomenanomalien, wie zurückhängende Chromosomen und Aneuploidien, aufweisen (Wuelling et al. in Begutachtung).

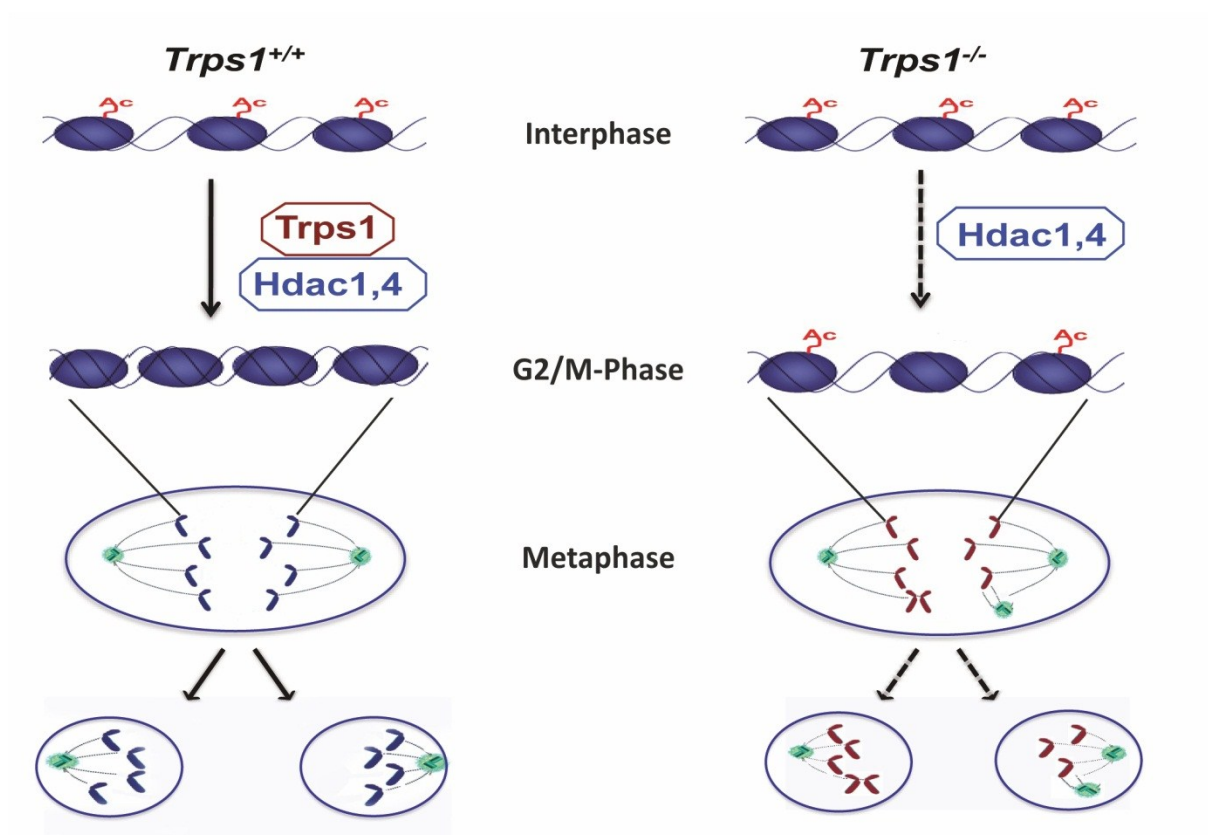


Abbildung 5-1: Modell: Trps1 reguliert zusammen mit Hdac1 und 4 die Mitose

(Wuelling et al. in Begutachtung)

5.4. Hdacs regulieren die ATDC5 Differenzierung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Inhibition von Hdac Proteinen die Differenzierung von ATDC5 Zellen beschleunigt, wobei der Inhibitor TSA dieses effektiver bewirkt, als der Inhibitor NaB. Es konnte bereits für einige Hdac Proteine eine Funktion in der Regulation von Differenzierungsprozessen in unterschiedlichen Zellen nachgewiesen werden. Hdac4 reguliert zusammen mit Runx2 und Mef2 die Differenzierung von Maus Chondrozyten *in vivo* (Arnold et al., 2007; Vega et al., 2004). Hdac4 inhibiert über Mef2 die Runx2 Aktivität, wobei Runx2 als Hauptaktivator der Chondrozyten Differenzierung gilt. Eine Inhibition von Hdac4 bewirkt demnach auch eine stärkere Differenzierung. Hdac1 ist als Inhibitor der Osteoblasten Differenzierung beschrieben (Lee et al., 2006). Hdac1 wirkt über eine Deacetylierung von Runx2 und Runx2 Zielgenen. Einen vergleichbaren Effekt auf die Osteoblasten Differenzierung haben auch Hdac3 (Schroeder et al., 2004) und Hdac6 im Zusammenspiel mit Runx2 (Jensen et al., 2009; Westendorf et al., 2002). Liegt Hdac6 nukleär vor, inhibiert es die Runx2 Aktivität auf die Differenzierung. Eine Inhibition von Hdac

Proteinen bewirkt in allen beschriebenen Studien eine gesteigerte Differenzierung. So kann man auch die gesteigerte ATDC5 Differenzierung in diese Reihe eingliedern. Die Inhibition von HAT Proteinen sorgt für eine reduzierte ATDC5 Differenzierung und dient durch die entgegengesetzte Auswirkung auf die Differenzierung als gute Negativkontrolle. Es gibt Hinweise, dass Hdacs auf Transkriptionsfaktoren wie Runx2 und Mef2 eine inhibierende Wirkung haben, als auch auf spezifische Zielgene dieser Transkriptionsfaktoren. Dabei werden die Zielgene und Transkriptionsfaktoren deacetyliert. Da TSA stärker auf die Differenzierung wirkt als NaB, wird eine größere Rolle von Hdac6 angenommen, da der Unterschied zwischen TSA und NaB in der Inhibition von Hdac6 liegt. Die Vermutung, dass Hdac6 über eine Tubulindeacetylierung (Boyault et al., 2007; Haggarty et al., 2003; Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002) auf die Differenzierung wirkt konnte nicht bestätigt werden. Es kann demnach vermutet werden, dass Hdac6 entweder über die Hsp90 Deacetylierung und dadurch durch die nukleäre Lokalisation von Transkriptionsfaktoren (Ai et al., 2009; Basak et al., 2008; Gibbs et al., 2009; Kekatpure et al., 2009; Kovacs et al., 2005) reguliert, oder direkt im Nukleus über eine Interaktion mit Runx2 (Jensen et al., 2009; Westendorf et al., 2002) die ATDC5 Differenzierung reguliert.

In C6 Gliomzellen wurde gezeigt, dass eine Hyperacetylierung nach HAT Aktivierung oder Hdac Inhibition zu einer gesenkten Proliferation und verstärkten Differenzierung führt (Yoo et al., 2012). Murine Lin-Sca1(+)CD31(+) EPCs und humane CD34(+) Zellen zeigten nach einer Behandlung mit Hdac, DNA-Methyltransferasen und Histon-Dimethyltransferase Inhibitoren eine verstärkte Differenzierung in Kardiomyozyten (Thal et al., 2012). Eine verstärkte globale Histonacetylierung geht mit einer stärkeren Differenzierung einher. Um zu testen, ob sich während der ATDC5 Differenzierung und gleichzeitigen Hdac Inhibition die Histonacetylierung ändert, wurde der H3K9ac Gehalt untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass über den Differenzierungszeitraum die Acetylierung trotz Hdac Inhibition nicht konstant erhöht ist. Das Acetylierungsprofil legt nahe, dass bis zu sieben Tagen der Differenzierung in differenzierenden Zellen die Acetylierung ansteigt und anschließend stark fällt. Da der Unterschied zwischen differenzierenden ATDC5 Zellen und differenzierenden Zellen, die zusätzlich mit Hdac Inhibitoren behandelt werden, im Acetylierungsgehalt nicht besonders groß ist, wird vermutet, dass die stärkere Differenzierung bei Hdac Inhibitor Behandlung nicht aufgrund einer globalen erhöhten H3K9 Acetylierung bewirkt wird, sondern, dass die höhere Acetylierung ein Effekt der stärkeren Differenzierung ist. ATDC5

Zellen, die differenzieren, haben nach sieben Tagen eine erhöhte H3K9 Acetylierung, die dann stark abfällt. Man könnte aber auch annehmen, dass in der ersten Woche der Differenzierung die Hdac Inhibitor Behandlung über die H3K9 Deacetylierung einen schnellere Differenzierung bewirkt. Im weiteren Verlauf der Differenzierung wäre eine höhere H3K9 Acetylierung aber nicht mehr notwendig weil evtl. HAT zu diesem Zeitpunkt nicht mehr aktiv sind. Somit würde eine Hdac Inhibition in der ersten Woche die Differenzierung beschleunigen, aber nach Induktion der Differenzierung keine Rolle mehr spielen. Welche Hypothese stimmt muss noch untersucht werden.

Die Hdac Inhibitoren könnten über eine Inhibition von Hdac Proteinen wirken, wobei nicht die Histon-, sondern die allgemeine Proteindeacetylasefunktion für eine stärkere Differenzierung verantwortlich ist. Wie bereits oben beschrieben deacetylieren Hdacs Transkriptionsfaktoren wie Runx2 und inhibieren so die Differenzierung (Jensen et al., 2009; Lee et al., 2006; Schroeder et al., 2004; Westendorf et al., 2002). Die Hdac Inhibitoren könnte aber auch über eine falsche Regulation der Lokalisation von Transkriptionsfaktoren (Ai et al., 2009; Basak et al., 2008; Gibbs et al., 2009; Kekatpure et al., 2009; Kovacs et al., 2005) funktionieren. Mit dieser Hypothese würde die verstärkte Rolle von Hdac6 während der Differenzierung erklärbar sein.

5.5. Trps1 kommt in Proteinkomplexen vor

Es ist bekannt, dass Trps1 mit dem Transkriptionsfaktoren Runx2 (Napierala et al., 2008), mit verschiedenen Hdacs und mit weiteren bisher noch nicht näher analysierten Transkriptionsfaktoren (diese Arbeit) interagiert. Weiterhin reguliert Trps1 die Aktivität verschiedener Promotoren (Runx2 und Stat3) und somit die Expression der jeweiligen Gene (Napierala et al., 2005; Suemoto et al., 2007). Aufgrund der Tatsache, dass Trps1 auf Transkriptionsebene die Genaktivität reguliert, aber auch direkt mit Transkriptionsfaktoren und Chromatinmodifikatoren interagiert, wird angenommen, dass Trps1 in größeren Transkriptionskomplexen vorliegt und als Adapterprotein die jeweiligen Bestandteile der Komplexe zusammenführt. Trps1 hat eine DNA-Binde-Domäne (Malik et al., 2001; Napierala et al., 2005), und kann mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren. Trps1 könnte Chromatinmodifikatoren wie Hdacs, die keine eigene DNA-Bindende Aktivität haben (Furumatsu and Ozaki, 2010), ans Chromatin rekrutieren. Um diese Hypothese zu

untersuchen, wurde mittels Gelfiltration analysiert, ob Trps1 in größeren Proteinkomplexen auftritt. Es konnte gezeigt werden, dass Trps1 nicht als Monomer in HEK293 EBNA Zellen auftritt und die Hdacs 1, 4 und 6 in komplexen der gleichen Größe vorkommen.

5.6. Trps1 interagiert mit Transkriptionsfaktoren, Chromatinmodifikatoren und Hitzeschock Proteinen

Mittels Co-IP und anschließender massenspektrometrischer Untersuchung (*Peptide-Mass-Fingerprint, PMF*) wurden weitere potentielle Interaktoren von Trps1 gefunden. Interessante Proteine sind die auf Transkriptionsebene wirkenden SP110 Nukleär Körper Protein, SUPT6H Protein, die Proteine aus der Hitzeschock Gruppe Hsp90, Hsp70, DnaJ und die Zytoplasmatischen Proteine Golgi Autoantigen (Golgin) Unterfamilie a3, die putative ATP-abhängige RNA Helikase P110 und der Eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 3. Das SP110 Nukleär Körper Protein ist als transkriptioneller Coaktivator Bestandteil eines Multiproteinkomplexes, welcher in PML-Körpern vorkommt und die Differenzierung von myeloiden Zellen reguliert (Bloch et al., 2000). Trps1 und Hdac Proteine können unter anderem ebenfalls in PML Körper detektiert werden (Hayakawa et al., 2008; Kaiser et al., 2003a). Eine Interaktion wäre demnach in PML Körpern möglich und somit auch die Regulation von Differenzierungsprozessen. Das SUPT6H Protein ist als transkriptioneller Regulator bekannt, der die mRNA Elongation durch die Polymerase II stimuliert, sowie als Chromatinmodifikator mit Histonen interagiert und deren Stabilität reguliert (Chiang et al., 1996; Endoh et al., 2004; Okazaki et al., 2011). Trps1 als Transkriptionsfaktor, der mit Histonmodifikatoren interagiert, könnte demnach ebenfalls im Komplex mit SUPT6H vorkommen. Eine Interaktion von Trps1 mit Hsp90 ist in 5.7 diskutiert. Da für Hsp70 (Mansilla et al., 2012) und DnaJ (Sterrenberg et al., 2011) hauptsächlich Chaperonfunktionen bekannt sind, wird vermutet, dass eine Interaktion mit Trps1 wohl hauptsächlich der Stabilität von Trps1 dient. DnaJ ist aber auch als Co-Chaperon von Hsp90 beschrieben (Sterrenberg et al., 2011) und könnte demnach auch die in 5.7 diskutierten Funktionen der Interaktion von Hsp90 und Trps1 unterstützen. Die Interaktionen mit der putativen ATP-abhängigen RNA Helikase P110, welches eine RNA-Bindende Funktion im Spleißosom hat (Bell et al., 2002), mit dem Golgi Autoantigen, welches eine Rolle im Vesikeltransport hat (Munro, 2011) und mit dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 3, dessen Funktion

in der Translation liegt (Kouba et al., 2012) würden im Zytoplasma stattfinden. Eine Rolle von Trps1 in diesen drei Prozessen ist aber eher unwahrscheinlich.

Ob Trps1 mit diesen Proteinen interagiert und was die Funktion dieser Interaktion ist, muss noch untersucht werden.

5.7. Trps1 interagiert mit Hsp90

Für die Interaktion von Trps1 und Hsp90 in proliferierenden ATDC5 Zellen sind zwei Hypothesen denkbar. Die erste bezieht sich auf die Tatsache, dass Hsp90 eine nukleäre Funktion in der Modulation der epigenetischen Chromatinstruktur hat. Hsp90 hat eine aktivierende Wirkung auf die Genexpression. Der Verlust von Hsp90 führt zu kompaktem Chromatin und somit zu einer Inhibition der Genexpression von Zielgenen (Ruden and Lu, 2008; Tariq et al., 2009). Findet eine Interaktion von Trps1 mit Hsp90 hauptsächlich im Nukleus statt, könnte man eine ähnlich stabilisierende Wirkung von Hsp90 auf den Histon bzw. Proteinmodifikationskomplex Trps1-Hdac postulieren. Hsp90 würde demnach in proliferierenden ATDC5 Zellen über Trps1 und Hdacs eine aktivierende Wirkung auf die Deacetylierung von Histonproteinen oder Transkriptionsfaktoren haben und so kompakteres Chromatin und/oder inaktivere Transkriptionsfaktoren z.B. Runx2 (Jeon et al., 2006; Kang et al., 2005) von Differenzierungsgenen bewirken. In differenzierenden ATDC5 Zellen ist die Trps1 und Hsp90 Interaktion deutlich schwächer, so dass die Inhibition von Differenzierungsgenen aufgehoben wäre.

Die zweite Hypothese bezieht sich darauf, dass über die Interaktion von Hsp90 und Hdac6 die zelluläre Lokalisation von Transkriptionsfaktoren reguliert werden kann (Ai et al., 2009; Basak et al., 2008; Kekatpure et al., 2009; Kovacs et al., 2005). Es ist bekannt, dass Trps1 sowohl mit Hdac6, als auch mit Hsp90 interagieren kann. Eine Regulation der Lokalisation von Trps1 könnte man sich demnach auch für den Komplex Hsp90-Hdac6-Trps1 vorstellen, wenn die Interaktion dieses Komplexes im Zytoplasma stattfindet. In proliferierenden ATDC5 Zellen liegt Trps1 im Zytoplasma vor und interagiert mit Hsp90. Aktives Hdac6 könnte die Interaktion durch eine Deacetylierung von Hsp90 fördern. Trps1 könnte so im Zytoplasma gehalten werden. Wird die Hdac6 Funktion inhibiert, differenzieren ATDC5 Zellen stärker (siehe 4.6). Hsp90 könnte hyperacetyliert vorliegen, wodurch die Interaktion mit Trps1 abnimmt, so dass Trps1 vom Zytoplasma in den Nukleus translozieren kann, um die

Differenzierung zu regulieren. In differenzierten ATDC5 Zellen könnte die Hsp90-Trps1 Interaktion, auch unabhängig von Hdac6, geringer sein, wenn Trps1 über andere Mechanismen im Nukleus gehalten wird, um die Differenzierung zu regulieren. Liegt Trps1 nicht im Zytoplasma vor, kann es auch nicht mit Hsp90 interagieren.

Um aufzuklären, ob eine der Hypothesen auf die Interaktion der beiden Proteine zutrifft könnte analysiert werden, in welchem Kompartiment die Trps1-Hsp90 Interaktion stattfindet. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Runx2 oder Histon H3 Acetylierung von der Trps1-Hsp90 Interaktion abhängig ist und ob Hsp90 oder Trps1 sogar Hdac6 abhängig deacetyliert werden, und dadurch die Trps1-Hsp90 Interaktion moduliert wird und ob sich folglich die Trps1 Lokalisation ändert.

6. Zusammenfassung

Trps1 ist ein Multi-Zinkfinger Transkriptionsfaktor, der regulatorische Funktionen während der Chondrozyten Proliferation und Differenzierung hat. Mutationen in der *Trps1* Gensequenz resultieren in Defekten der Knochenentwicklung, wie Missbildungen des Gesichts, Kleinwuchs und einem frühzeitigen Verschluss der Wachstumsfuge. Wie Trps1 während der enchondralen Ossifikation regulatorische Funktionen ausübt, ist bisher nicht genau bekannt. Um die Funktion von Trps1 aufzuschlüsseln, wurden Co-Immunpräzipitations-Interaktionsstudien (Co-IP) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass Trps1 endogen auf Proteinebene mit Hdac4, Hdac6 und Hsp90 interagiert.

Mittels Gelfiltrationsanalysen der Proteinkomplexe in Zelllysaten konnte gezeigt werden, dass Trps1 nicht als Monomer vorliegt, sondern nur in größeren Komplexen zwischen 307 und 687 kDa vorkommt und Überschneidungen mit Hdac1, Hdac4 und Hdac6 Proteinen hat, so dass vermutet werden kann, dass diese Proteine gemeinsam in Transkriptionskomplexen vorliegen können.

In einer massenspektrometrischen Analyse von Trps1 Co-IPs wurden neue potentielle Interaktoren des Trps1 Proteins identifiziert. Diese sind der Transkriptionsfaktor SUPT6H, das Nukleäre Körper Protein SP110, die RNA Helikase P110, sowie weitere Proteine der Hitze Schock Gruppe, wie Hsp70 und DnaJ.

Die Analyse der H3K9 und H3K18 Acetylierung und der Hdac Aktivität in Zellkulturen und Proteinextrakte aus Extremitäten verdeutlicht eine aktivierende Wirkung von Trps1 auf die Hdac Aktivität. Ein Verlust von Trps1 resultiert somit in hyperacetyliertem Chromatin. Diese Hyperacetylierung kann zu, in *Trps1*^{-/-} Mäusen bekannten, Mitosedefekten führen.

Eine Hdac Inhibition, mittels TSA und NaB, während der Differenzierung der chondrogenen ATDC5 Zelllinie resultiert in einer stärkeren und beschleunigten Differenzierung. Eine Analyse der H3K9 Acetylierung während der Differenzierung zeigt jedoch einen Anstieg der Acetylierung nach sieben Tagen und anschließend einen Abfall der Acetylierung unabhängig von der Hdac Inhibition. Entweder wird für eine beschleunigte Differenzierung, durch Hdac Inhibition, nur ein Puls in der ersten Woche benötigt, oder die Inhibitoren wirken nicht auf die Histonedeaecetylierung, sondern auf die Deacetylierung anderer Proteine wie z.B. Runx2, das ebenfalls von Hdacs deacetyliert werden kann. Somit könnte der Anstieg in der

Acetylierung ein sekundärer Effekt sein, der durch die beschleunigte Differenzierung verursacht wird, die wiederum durch eine Deacetylierung anderer Proteine ausgelöst wurde.

7. Abstract

Trps1 is a multi-zinc finger transcription factor, regulating chondrocyte proliferation and differentiation. Mutations in the *Trps1* gene sequence results in defects of bone formation, like malformations of the facial bones, dwarfism and a premature closure of the growth plate. But how Trps1 is regulating the endochondral ossification is not exactly known so far. To elucidate the details of Trps1 function, Co-Immunoprecipitation (Co-IP) interaction studies were performed. In this study could be shown, that endogenous Trps1 interacts on protein level with endogenous Hdac4, Hdac6 and Hsp90. Gelfiltration experiments with protein complexes of cell lysates show that Trps1 elutes not as a monomer but in higher order complexes between 307 and 687 kDa. Hdac1, Hdac4 and Hdac6 elute partly in the same fractions, so that it can be assumed that these proteins could act together in the same transcription complexes.

The analysis of H3K9 and H3K18 acetylation and Hdac activity in cell cultures and mouse limb extracts points up an activating Trps1 action on Hdac activity. Trps1 deficiency results in hyperacetylated chromatin. This could lead to defects in mitosis, which are common in *Trps1*^{-/-} mice.

In a mass spectrometric analysis of Trps1 Co-IPs new potential Trps1 interacting proteins could be identified. These are the transcription factor SUPT6H, the Nuclear Body Protein SP110, the RNA Helicase P110, as well as proteins of the heat shock group like Hsp70 and DnaJ.

Hdac inhibition, due to TSA and NaB treatment, during differentiation of chondrogenic ATDC5 cells results in a stronger and faster differentiation. But the analysis of the H3K9 acetylation during the differentiation process showed, despite Hdac inhibition, the acetylation is enhanced in the first week, only. From the second week on the acetylation is steadily reduced. Either the Hdac inhibition pulse is only needed in the first week for an accelerated differentiation, or the inhibitors act by deacetylating other proteins like Runx2, which can be deacetylated by Hdacs. So the enhanced acetylation in the first week could be a secondary effect due to an enhanced differentiation, which resulted from deacetylation of other proteins.

8. Literaturverzeichnis

Ai, J., Wang, Y., Dar, J.A., Liu, J., Liu, L., Nelson, J.B., and Wang, Z. (2009). HDAC6 regulates androgen receptor hypersensitivity and nuclear localization via modulating Hsp90 acetylation in castration-resistant prostate cancer. *Molecular endocrinology* 23, 1963-1972.

Arnold, M.A., Kim, Y., Czubryt, M.P., Phan, D., McAnally, J., Qi, X., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2007). MEF2C transcription factor controls chondrocyte hypertrophy and bone development. *Developmental cell* 12, 377-389.

Atsumi, T., Miwa, Y., Kimata, K., and Ikawa, Y. (1990). A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. *Cell differentiation and development : the official journal of the International Society of Developmental Biologists* 30, 109-116.

Basak, S., Pookot, D., Noonan, E.J., and Dahiya, R. (2008). Genistein down-regulates androgen receptor by modulating HDAC6-Hsp90 chaperone function. *Molecular cancer therapeutics* 7, 3195-3202.

Beier, F. (2005). Cell-cycle control and the cartilage growth plate. *Journal of cellular physiology* 202, 1-8.

Bell, M., Schreiner, S., Damianov, A., Reddy, R., and Bindereif, A. (2002). p110, a novel human U6 snRNP protein and U4/U6 snRNP recycling factor. *The EMBO journal* 21, 2724-2735.

Bhaskara, S., Chyla, B.J., Amann, J.M., Knutson, S.K., Cortez, D., Sun, Z.W., and Hiebert, S.W. (2008). Deletion of histone deacetylase 3 reveals critical roles in S phase progression and DNA damage control. *Molecular cell* 30, 61-72.

Bi, W., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R., and de Crombrughe, B. (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nature genetics* 22, 85-89.

Bloch, D.B., Nakajima, A., Gulick, T., Chiche, J.D., Orth, D., de La Monte, S.M., and Bloch, K.D. (2000). Sp110 localizes to the PML-Sp100 nuclear body and may function as a nuclear hormone receptor transcriptional coactivator. *Molecular and cellular biology* 20, 6138-6146.

Boyault, C., Sadoul, K., Pabion, M., and Khochbin, S. (2007). HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene* 26, 5468-5476.

Bradley, E.W., McGee-Lawrence, M.E., and Westendorf, J.J. (2011). Hdac-mediated control of endochondral and intramembranous ossification. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 21, 101-113.

- Cadot, B., Brunetti, M., Coppari, S., Fedeli, S., de Rinaldis, E., Dello Russo, C., Gallinari, P., De Francesco, R., Steinkuhler, C., and Filocamo, G. (2009). Loss of histone deacetylase 4 causes segregation defects during mitosis of p53-deficient human tumor cells. *Cancer research* 69, 6074-6082.
- Calderwood, S.K., Khaleque, M.A., Sawyer, D.B., and Ciocca, D.R. (2006). Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends in biochemical sciences* 31, 164-172.
- Chang, S., McKinsey, T.A., Zhang, C.L., Richardson, J.A., Hill, J.A., and Olson, E.N. (2004). Histone deacetylases 5 and 9 govern responsiveness of the heart to a subset of stress signals and play redundant roles in heart development. *Molecular and cellular biology* 24, 8467-8476.
- Chang, S., Young, B.D., Li, S., Qi, X., Richardson, J.A., and Olson, E.N. (2006). Histone deacetylase 7 maintains vascular integrity by repressing matrix metalloproteinase 10. *Cell* 126, 321-334.
- Chiang, P.W., Baldacci, P.A., Babinet, C., Camper, S.A., Watkins-Chow, D., Baker, D.D., Tsai, C.H., Ramamoorthy, S., King, E., Slack, A.C., *et al.* (1996). Linkage mapping of murine homolog of the yeast SPT6 gene to MMU11B1. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 7, 459-460.
- Chini, C.C., Escande, C., Nin, V., and Chini, E.N. (2010). HDAC3 is negatively regulated by the nuclear protein DBC1. *The Journal of biological chemistry* 285, 40830-40837.
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnäd, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V., and Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325, 834-840.
- Cimini, D., Mattiuzzo, M., Torosantucci, L., and Degrossi, F. (2003). Histone hyperacetylation in mitosis prevents sister chromatid separation and produces chromosome segregation defects. *Molecular biology of the cell* 14, 3821-3833.
- Clarke, J.D., Hsu, A., Yu, Z., Dashwood, R.H., and Ho, E. (2011). Differential effects of sulforaphane on histone deacetylases, cell cycle arrest and apoptosis in normal prostate cells versus hyperplastic and cancerous prostate cells. *Molecular nutrition & food research* 55, 999-1009.
- Correa, D., Hesse, E., Seriwatanachai, D., Kiviranta, R., Saito, H., Yamana, K., Neff, L., Atfi, A., Coillard, L., Sitara, D., *et al.* (2010). Zfp521 is a target gene and key effector of parathyroid hormone-related peptide signaling in growth plate chondrocytes. *Developmental cell* 19, 533-546.
- Csermely, P., Kajtar, J., Hollosi, M., Oikarinen, J., and Somogyi, J. (1994). The 90 kDa heat shock protein (hsp90) induces the condensation of the chromatin structure. *Biochemical and biophysical research communications* 202, 1657-1663.

de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S., and van Kuilenburg, A.B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *The Biochemical journal* 370, 737-749.

Elima, K., Eerola, I., Rosati, R., Metsaranta, M., Garofalo, S., Perala, M., De Crombrughe, B., and Vuorio, E. (1993). The mouse collagen X gene: complete nucleotide sequence, exon structure and expression pattern. *The Biochemical journal* 289 (Pt 1), 247-253.

Endoh, M., Zhu, W., Hasegawa, J., Watanabe, H., Kim, D.K., Aida, M., Inukai, N., Narita, T., Yamada, T., Furuya, A., *et al.* (2004). Human Spt6 stimulates transcription elongation by RNA polymerase II in vitro. *Molecular and cellular biology* 24, 3324-3336.

Eot-Houllier, G., Fulcrand, G., Watanabe, Y., Magnaghi-Jaulin, L., and Jaulin, C. (2008). Histone deacetylase 3 is required for centromeric H3K4 deacetylation and sister chromatid cohesion. *Genes & development* 22, 2639-2644.

Fantauzzo, K.A., Bazzi, H., Jahoda, C.A., and Christiano, A.M. (2008). Dynamic expression of the zinc-finger transcription factor Trps1 during hair follicle morphogenesis and cycling. *Gene expression patterns : GEP* 8, 51-57.

Floer, M., Bryant, G.O., and Ptashne, M. (2008). HSP90/70 chaperones are required for rapid nucleosome removal upon induction of the GAL genes of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2975-2980.

Freeman, B.C., and Yamamoto, K.R. (2002). Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones. *Science* 296, 2232-2235.

Furumatsu, T., and Asahara, H. (2010). Histone acetylation influences the activity of Sox9-related transcriptional complex. *Acta medica Okayama* 64, 351-357.

Furumatsu, T., and Ozaki, T. (2010). Epigenetic regulation in chondrogenesis. *Acta medica Okayama* 64, 155-161.

Gabrielli, B., Chia, K., and Warrener, R. (2011). Finally, how histone deacetylase inhibitors disrupt mitosis! *Cell cycle* 10, 2658-2661.

Gack, S., Vallon, R., Schmidt, J., Grigoriadis, A., Tuckermann, J., Schenkel, J., Weiher, H., Wagner, E.F., and Angel, P. (1995). Expression of interstitial collagenase during skeletal development of the mouse is restricted to osteoblast-like cells and hypertrophic chondrocytes. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 6, 759-767.

Gibbs, A., Schwartzman, J., Deng, V., and Alumkal, J. (2009). Sulforaphane destabilizes the androgen receptor in prostate cancer cells by inactivating histone deacetylase 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 16663-16668.

Glozak, M.A., Sengupta, N., Zhang, X., and Seto, E. (2005). Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 363, 15-23.

Haggarty, S.J., Koeller, K.M., Wong, J.C., Grozinger, C.M., and Schreiber, S.L. (2003). Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4389-4394.

Hall, B.K., and Miyake, T. (2000). All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 22, 138-147.

Hayakawa, F., Abe, A., Kitabayashi, I., Pandolfi, P.P., and Naoe, T. (2008). Acetylation of PML is involved in histone deacetylase inhibitor-mediated apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 283, 24420-24425.

Heit, R., Rattner, J.B., Chan, G.K., and Hendzel, M.J. (2009). G2 histone methylation is required for the proper segregation of chromosomes. *Journal of cell science* 122, 2957-2968.

Hesse, E., Saito, H., Kiviranta, R., Correa, D., Yamana, K., Neff, L., Toben, D., Duda, G., Atfi, A., Geoffroy, V., *et al.* (2010). Zfp521 controls bone mass by HDAC3-dependent attenuation of Runx2 activity. *The Journal of cell biology* 191, 1271-1283.

Hong, S., Derfoul, A., Pereira-Mouries, L., and Hall, D.J. (2009). A novel domain in histone deacetylase 1 and 2 mediates repression of cartilage-specific genes in human chondrocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 3539-3552.

Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F., and Yao, T.P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417, 455-458.

Huh, Y.H., Ryu, J.H., and Chun, J.S. (2007). Regulation of type II collagen expression by histone deacetylase in articular chondrocytes. *The Journal of biological chemistry* 282, 17123-17131.

Hung, J.J., Wu, C.Y., Liao, P.C., and Chang, W.C. (2005). Hsp90alpha recruited by Sp1 is important for transcription of 12(S)-lipoxygenase in A431 cells. *The Journal of biological chemistry* 280, 36283-36292.

Ishii, S., Kurasawa, Y., Wong, J., and Yu-Lee, L.Y. (2008). Histone deacetylase 3 localizes to the mitotic spindle and is required for kinetochore-microtubule attachment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 4179-4184.

Itoh, S., Kanno, S., Gai, Z., Suemoto, H., Kawakatsu, M., Tanishima, H., Morimoto, Y., Nishioka, K., Hatamura, I., Yoshida, M., *et al.* (2008). Trps1 plays a pivotal role downstream

of Gdf5 signaling in promoting chondrogenesis and apoptosis of ATDC5 cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 13, 355-363.

Jensen, E.D., Gopalakrishnan, R., and Westendorf, J.J. (2009). Bone morphogenic protein 2 activates protein kinase D to regulate histone deacetylase 7 localization and repression of Runx2. *The Journal of biological chemistry* 284, 2225-2234.

Jensen, E.D., Nair, A.K., and Westendorf, J.J. (2007). Histone deacetylase co-repressor complex control of Runx2 and bone formation. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 17, 187-196.

Jensen, E.D., Schroeder, T.M., Bailey, J., Gopalakrishnan, R., and Westendorf, J.J. (2008). Histone deacetylase 7 associates with Runx2 and represses its activity during osteoblast maturation in a deacetylation-independent manner. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 23, 361-372.

Jeon, E.J., Lee, K.Y., Choi, N.S., Lee, M.H., Kim, H.N., Jin, Y.H., Ryoo, H.M., Choi, J.Y., Yoshida, M., Nishino, N., *et al.* (2006). Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation. *The Journal of biological chemistry* 281, 16502-16511.

Kaiser, F.J., Ludecke, H.J., and Weger, S. (2007). SUMOylation modulates transcriptional repression by TRPS1. *Biological chemistry* 388, 381-390.

Kaiser, F.J., Moroy, T., Chang, G.T., Horsthemke, B., and Ludecke, H.J. (2003a). The RING finger protein RNF4, a co-regulator of transcription, interacts with the TRPS1 transcription factor. *The Journal of biological chemistry* 278, 38780-38785.

Kaiser, F.J., Tavassoli, K., Van den Bemd, G.J., Chang, G.T., Horsthemke, B., Moroy, T., and Ludecke, H.J. (2003b). Nuclear interaction of the dynein light chain LC8a with the TRPS1 transcription factor suppresses the transcriptional repression activity of TRPS1. *Human molecular genetics* 12, 1349-1358.

Kang, J.S., Alliston, T., Delston, R., and Derynck, R. (2005). Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3. *The EMBO journal* 24, 2543-2555.

Kaufmann, M.H. (1992). *The atlas of mouse development*. Academic press.

Kekatpure, V.D., Dannenberg, A.J., and Subbaramaiah, K. (2009). HDAC6 modulates Hsp90 chaperone activity and regulates activation of aryl hydrocarbon receptor signaling. *The Journal of biological chemistry* 284, 7436-7445.

Kim, D.W., and Lassar, A.B. (2003). Smad-dependent recruitment of a histone deacetylase/Sin3A complex modulates the bone morphogenetic protein-dependent transcriptional repressor activity of Nkx3.2. *Molecular and cellular biology* 23, 8704-8717.

- Kouba, T., Rutkai, E., Karaskova, M., and Valasek, L. (2012). The eIF3c/NIP1 PCI domain interacts with RNA and RACK1/ASC1 and promotes assembly of translation preinitiation complexes. *Nucleic acids research* 40, 2683-2699.
- Kovacs, J.J., Murphy, P.J., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J.T., Nicchitta, C.V., Yoshida, M., Toft, D.O., Pratt, W.B., and Yao, T.P. (2005). HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Molecular cell* 18, 601-607.
- Kronenberg, H.M. (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423, 332-336.
- Kruhlak, M.J., Hendzel, M.J., Fischle, W., Bertos, N.R., Hameed, S., Yang, X.J., Verdin, E., and Bazett-Jones, D.P. (2001). Regulation of global acetylation in mitosis through loss of histone acetyltransferases and deacetylases from chromatin. *The Journal of biological chemistry* 276, 38307-38319.
- Kunath, M., Ludecke, H.J., and Vortkamp, A. (2002). Expression of Trps1 during mouse embryonic development. *Mechanisms of development* 119 Suppl 1, S117-120.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lagger, G., O'Carroll, D., Rembold, M., Khier, H., Tischler, J., Weitzer, G., Schuettengruber, B., Hauser, C., Brunmeir, R., Jenuwein, T., *et al.* (2002). Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *The EMBO journal* 21, 2672-2681.
- Lee, H.W., Suh, J.H., Kim, A.Y., Lee, Y.S., Park, S.Y., and Kim, J.B. (2006). Histone deacetylase 1-mediated histone modification regulates osteoblast differentiation. *Molecular endocrinology* 20, 2432-2443.
- Lee, N.K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J.D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P.J., McKee, M.D., Jung, D.Y., *et al.* (2007). Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130, 456-469.
- Li, Y., Kao, G.D., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Qin, J., Phelan, C., and Lazar, M.A. (2006). A novel histone deacetylase pathway regulates mitosis by modulating Aurora B kinase activity. *Genes & development* 20, 2566-2579.
- Liu, C.J., Prazak, L., Fajardo, M., Yu, S., Tyagi, N., and Di Cesare, P.E. (2004). Leukemia/lymphoma-related factor, a POZ domain-containing transcriptional repressor, interacts with histone deacetylase-1 and inhibits cartilage oligomeric matrix protein gene expression and chondrogenesis. *The Journal of biological chemistry* 279, 47081-47091.
- Magnaghi-Jaulin, L., Eot-Houllier, G., Fulcrand, G., and Jaulin, C. (2007). Histone deacetylase inhibitors induce premature sister chromatid separation and override the mitotic spindle assembly checkpoint. *Cancer research* 67, 6360-6367.

Malik, T.H., Shoichet, S.A., Latham, P., Kroll, T.G., Peters, L.L., and Shivdasani, R.A. (2001). Transcriptional repression and developmental functions of the atypical vertebrate GATA protein TRPS1. *The EMBO journal* 20, 1715-1725.

Malik, T.H., Von Stechow, D., Bronson, R.T., and Shivdasani, R.A. (2002). Deletion of the GATA domain of TRPS1 causes an absence of facial hair and provides new insights into the bone disorder in inherited tricho-rhino-phalangeal syndromes. *Molecular and cellular biology* 22, 8592-8600.

Mansilla, M.J., Montalban, X., and Espejo, C. (2012). Heat Shock Protein 70: Roles in Multiple Sclerosis. *Molecular medicine*.

Mariani, F.V., and Martin, G.R. (2003). Deciphering skeletal patterning: clues from the limb. *Nature* 423, 319-325.

Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., *et al.* (2002). In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *The EMBO journal* 21, 6820-6831.

McGee-Lawrence, M.E., and Westendorf, J.J. (2011). Histone deacetylases in skeletal development and bone mass maintenance. *Gene* 474, 1-11.

Momeni, P., Glockner, G., Schmidt, O., von Holtum, D., Albrecht, B., Gillesen-Kaesbach, G., Hennekam, R., Meinecke, P., Zabel, B., Rosenthal, A., *et al.* (2000). Mutations in a new gene, encoding a zinc-finger protein, cause tricho-rhino-phalangeal syndrome type I. *Nature genetics* 24, 71-74.

Munro, S. (2011). The golgin coiled-coil proteins of the Golgi apparatus. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3.

Murtaugh, L.C., Zeng, L., Chyung, J.H., and Lassar, A.B. (2001). The chick transcriptional repressor Nkx3.2 acts downstream of Shh to promote BMP-dependent axial chondrogenesis. *Developmental cell* 1, 411-422.

Napierala, D., Garcia-Rojas, X., Sam, K., Wakui, K., Chen, C., Mendoza-Londono, R., Zhou, G., Zheng, Q., and Lee, B. (2005). Mutations and promoter SNPs in RUNX2, a transcriptional regulator of bone formation. *Molecular genetics and metabolism* 86, 257-268.

Napierala, D., Sam, K., Morello, R., Zheng, Q., Munivez, E., Shivdasani, R.A., and Lee, B. (2008). Uncoupling of chondrocyte differentiation and perichondrial mineralization underlies the skeletal dysplasia in tricho-rhino-phalangeal syndrome. *Human molecular genetics* 17, 2244-2254.

Ng, L.J., Wheatley, S., Muscat, G.E., Conway-Campbell, J., Bowles, J., Wright, E., Bell, D.M., Tam, P.P., Cheah, K.S., and Koopman, P. (1997). SOX9 binds DNA, activates transcription, and

coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Developmental biology* 183, 108-121.

Nishioka, K., Itoh, S., Suemoto, H., Kanno, S., Gai, Z., Kawakatsu, M., Tanishima, H., Morimoto, Y., Hatamura, I., Yoshida, M., *et al.* (2008). Trps1 deficiency enlarges the proliferative zone of growth plate cartilage by upregulation of Pthrp. *Bone* 43, 64-71.

Ocker, M., and Schneider-Stock, R. (2007). Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21cip1/waf1. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 1367-1374.

Okazaki, I.M., Okawa, K., Kobayashi, M., Yoshikawa, K., Kawamoto, S., Nagaoka, H., Shinkura, R., Kitawaki, Y., Taniguchi, H., Natsume, T., *et al.* (2011). Histone chaperone Spt6 is required for class switch recombination but not somatic hypermutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 7920-7925.

Olsen, B.R., Reginato, A.M., and Wang, W. (2000). Bone development. *Annual review of cell and developmental biology* 16, 191-220.

Oury, F., Sumara, G., Sumara, O., Ferron, M., Chang, H., Smith, C.E., Hermo, L., Suarez, S., Roth, B.L., Ducy, P., *et al.* (2011). Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell* 144, 796-809.

Park, J.A., Kim, A.J., Kang, Y., Jung, Y.J., Kim, H.K., and Kim, K.C. (2011). Deacetylation and methylation at histone H3 lysine 9 (H3K9) coordinate chromosome condensation during cell cycle progression. *Molecules and cells* 31, 343-349.

Peserico, A., and Simone, C. (2011). Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011, 371832.

Quarles, L.D. (2008). Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *The Journal of clinical investigation* 118, 3820-3828.

Razidlo, D.F., Whitney, T.J., Casper, M.E., McGee-Lawrence, M.E., Stensgard, B.A., Li, X., Secreto, F.J., Knutson, S.K., Hiebert, S.W., and Westendorf, J.J. (2010). Histone deacetylase 3 depletion in osteo/chondroprogenitor cells decreases bone density and increases marrow fat. *PloS one* 5, e11492.

Richon, V.M., Sandhoff, T.W., Rifkind, R.A., and Marks, P.A. (2000). Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10014-10019.

Robbins, A.R., Jablonski, S.A., Yen, T.J., Yoda, K., Robey, R., Bates, S.E., and Sackett, D.L. (2005). Inhibitors of histone deacetylases alter kinetochore assembly by disrupting pericentromeric heterochromatin. *Cell cycle* 4, 717-726.

- Ruden, D.M., and Lu, X. (2008). Hsp90 affecting chromatin remodeling might explain transgenerational epigenetic inheritance in *Drosophila*. *Current genomics* 9, 500-508.
- Schnaider, T., Oikarinen, J., Ishiwatari-Hayasaka, H., Yahara, I., and Csermely, P. (1999). Interactions of Hsp90 with histones and related peptides. *Life sciences* 65, 2417-2426.
- Schroeder, T.M., Kahler, R.A., Li, X., and Westendorf, J.J. (2004). Histone deacetylase 3 interacts with runx2 to repress the osteocalcin promoter and regulate osteoblast differentiation. *The Journal of biological chemistry* 279, 41998-42007.
- Shimizu, E., Selvamurugan, N., Westendorf, J.J., Olson, E.N., and Partridge, N.C. (2010). HDAC4 represses matrix metalloproteinase-13 transcription in osteoblastic cells, and parathyroid hormone controls this repression. *The Journal of biological chemistry* 285, 9616-9626.
- Shin, H.J., Baek, K.H., Jeon, A.H., Kim, S.J., Jang, K.L., Sung, Y.C., Kim, C.M., and Lee, C.W. (2003). Inhibition of histone deacetylase activity increases chromosomal instability by the aberrant regulation of mitotic checkpoint activation. *Oncogene* 22, 3853-3858.
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., and McMahon, A.P. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes & development* 13, 2072-2086.
- Sterrenberg, J.N., Blatch, G.L., and Edkins, A.L. (2011). Human DNAJ in cancer and stem cells. *Cancer letters* 312, 129-142.
- Suemoto, H., Muragaki, Y., Nishioka, K., Sato, M., Ooshima, A., Itoh, S., Hatamura, I., Ozaki, M., Braun, A., Gustafsson, E., *et al.* (2007). Trps1 regulates proliferation and apoptosis of chondrocytes through Stat3 signaling. *Developmental biology* 312, 572-581.
- Tariq, M., Nussbaumer, U., Chen, Y., Beisel, C., and Paro, R. (2009). Trithorax requires Hsp90 for maintenance of active chromatin at sites of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 1157-1162.
- Thal, M.A., Krishnamurthy, P., Mackie, A.R., Hoxha, E., Lambers, E., Verma, S., Ramirez, V., Qin, G., Losordo, D.W., and Kishore, R. (2012). Enhanced angiogenic and cardiomyocyte differentiation capacity of epigenetically reprogrammed mouse and human endothelial progenitor cells augments their efficacy for ischemic myocardial repair. *Circulation research* 111, 180-190.
- Trivedi, C.M., Luo, Y., Yin, Z., Zhang, M., Zhu, W., Wang, T., Floss, T., Goettlicher, M., Noppinger, P.R., Wurst, W., *et al.* (2007). Hdac2 regulates the cardiac hypertrophic response by modulating Gsk3 beta activity. *Nature medicine* 13, 324-331.

- Valenzuela-Fernandez, A., Cabrero, J.R., Serrador, J.M., and Sanchez-Madrid, F. (2008). HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions. *Trends in cell biology* 18, 291-297.
- Valls, E., Sanchez-Molina, S., and Martinez-Balbas, M.A. (2005). Role of histone modifications in marking and activating genes through mitosis. *The Journal of biological chemistry* 280, 42592-42600.
- Vega, R.B., Matsuda, K., Oh, J., Barbosa, A.C., Yang, X., Meadows, E., McAnally, J., Pomajzl, C., Shelton, J.M., Richardson, J.A., *et al.* (2004). Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* 119, 555-566.
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G.V., Kronenberg, H.M., and Tabin, C.J. (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273, 613-622.
- Westendorf, J.J. (2006). Transcriptional co-repressors of Runx2. *Journal of cellular biochemistry* 98, 54-64.
- Westendorf, J.J. (2007). Histone deacetylases in control of skeletogenesis. *Journal of cellular biochemistry* 102, 332-340.
- Westendorf, J.J., Zaidi, S.K., Cascino, J.E., Kahler, R., van Wijnen, A.J., Lian, J.B., Yoshida, M., Stein, G.S., and Li, X. (2002). Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with histone deacetylase 6 and represses the p21(CIP1/WAF1) promoter. *Molecular and cellular biology* 22, 7982-7992.
- Wright, E., Hargrave, M.R., Christiansen, J., Cooper, L., Kun, J., Evans, T., Gangadharan, U., Greenfield, A., and Koopman, P. (1995). The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nature genetics* 9, 15-20.
- Wuelling, M., Kaiser, F.J., Buelens, L.A., Braunholz, D., Shivdasani, R.A., Depping, R., and Vortkamp, A. (2009). Trps1, a regulator of chondrocyte proliferation and differentiation, interacts with the activator form of Gli3. *Developmental biology* 328, 40-53.
- Wuelling, M., and Vortkamp, A. (2010). Transcriptional networks controlling chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification. *Pediatric nephrology* 25, 625-631.
- Wuelling, M., and Vortkamp, A. (2011). Chondrocyte proliferation and differentiation. *Endocrine development* 21, 1-11.
- Xin, H., Yoon, H.G., Singh, P.B., Wong, J., and Qin, J. (2004). Components of a pathway maintaining histone modification and heterochromatin protein 1 binding at the pericentric heterochromatin in Mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 9539-9546.

Yang, W.M., Tsai, S.C., Wen, Y.D., Fejer, G., and Seto, E. (2002). Functional domains of histone deacetylase-3. *The Journal of biological chemistry* 277, 9447-9454.

Yin, T., and Li, L. (2006). The stem cell niches in bone. *The Journal of clinical investigation* 116, 1195-1201.

Yoo, S., Lee, Y.G., Kim, J.H., Byeon, S.E., Rho, H.S., Cho, J.Y., and Hong, S. (2012). Cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-induced histone hyperacetylation contributes to its antiproliferative and differentiation-inducing activities. *Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of biosciences* 67, 222-232.

Zeng, L., Kempf, H., Murtaugh, L.C., Sato, M.E., and Lassar, A.B. (2002). Shh establishes an Nkx3.2/Sox9 autoregulatory loop that is maintained by BMP signals to induce somitic chondrogenesis. *Genes & development* 16, 1990-2005.

Zhang, X., Zhang, Z., Chen, G., Zhao, M., Wang, D., Zhang, X., Du, Z., Xu, Y., and Yu, X. (2010). FK228 induces mitotic catastrophe in A549 cells by mistargeting chromosomal passenger complex localization through changing centromeric H3K9 hypoacetylation. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 42, 677-687.

Zhang, Y., Kwon, S., Yamaguchi, T., Cubizolles, F., Rousseaux, S., Kneissel, M., Cao, C., Li, N., Cheng, H.L., Chua, K., *et al.* (2008). Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. *Molecular and cellular biology* 28, 1688-1701.

Zhao, Q., Eberspaecher, H., Lefebvre, V., and De Crombrughe, B. (1997). Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 209, 377-386.

9. Anhang

9.1. Tabellen

Tabelle 9-1: Pixel Messung der H3K9 und H3K18 Acetylierung in Trps1 Wildtyp und mutanten Mäusen

	H3	H3-Hg	H3K9ac	H3K9ac-Hg	H3K9ac/H3
Trps1^{+/+} (602638)	44.237.476	43.169.353	35.194.374	34.249.272	0,79337006
Trps1^{+/+} (602834)	45.046.275	43.978.152	33.146.456	32.201.354	0,73221253
Trps1^{+/+} (602914)	41.746.102	40.677.979	28.509.035	27.563.933	0,67761314
Trps1^{-/-} (602638)	35.465.034	34.396.911	29.945.384	29.000.282	0,84310716
Trps1^{-/-} (602834)	45.985.356	44.917.233	40.912.675	39.967.573	0,88980488
Trps1^{-/-} (602914)	40.129.492	39.061.369	38.120.455	37.175.353	0,95171659
Hintergrund (Hg)	1.068.123		945.102		
Ø Trps1^{+/+}					0,73439858
STABW					0,05790941
Ø Trps1^{-/-}					0,89487621
STABW					0,05448202
ttest					0,02498952
	H3	H3-Hg	H3K18ac	H3K18ac-Hg	H3K18ac/H3
Trps1^{+/+} (602638)	34.578.860	33.010.399	21.345.985	20.802.173	0,6301703
Trps1^{+/+} (602834)	67.104.204	65.535.743	41.759.867	41.216.055	0,62890956
Trps1^{+/+} (602914)	47.799.023	46.230.562	31.120.834	30.577.022	0,66140278
Trps1^{-/-} (602638)	28.567.871	26.999.410	19.834.574	19.290.762	0,71448828
Trps1^{-/-} (602834)	60.671.176	59.102.715	49.825.474	49.281.662	0,83383076
Trps1^{-/-} (602914)	42.121.923	40.553.462	30.465.265	29.921.453	0,73782734
Hintergrund (Hg)	1.568.461		543.812		
Ø Trps1^{+/+}					0,64016088
STABW					0,01840682
Ø Trps1^{-/-}					0,76204879
STABW					0,06325082
ttest					0,03275029

Tabelle 9-2: Hdac Aktivität nach Trps1 und Hdac4 Expression

	u.t.	Trps1	Hdac4	Trps1 + Hdac4
1	15425	16683	17799	18290
2	15123	16412	17978	18467
3	15598	16988	17701	18624
STABW	240,401747	288,1671968	140,459959	167,0997706
Ø	15382	16694,33333	17826	18460,33333
ttest		0,003750366	0,00010913	0,0073172
Prozent Ø	1	1,08531617	1,15888701	1,200125688
Prozent STABW	0,01562877	0,0187	0,00913145	0,010863332

Tabelle 9-3: Hdac Aktivität in Arm-Extrakten von Wildtyp Mäusen und Trps1 Mutanten

	Trps1 ^{+/+}	Trps1 ^{+/+} + TSA	Trps1 ^{-/-}	Trps1 ^{-/-} + TSA
1	20562	18573	19874	18264
2	20374	19086	19274	18514
3	20087	18929	19089	18800
∅	20341	18863	19412	18526
STABW	239,213294	262,8542055	410,375844	268,201417
ttest		0,001967489	0,02762512	0,03513635
Prozent ∅	1	0,927322485	0,95434508	0,91077135
Prozent STABW	0,01176015	0,012922384	0,02017481	0,01318526

Tabelle 9-4: Hdac Aktivität nach Trps1 und Hdac1 siRNA Transfektion

	u.t.	Hdac1 siRNA	Trps1	Trps1 + Hdac1 siRNA	unsp. siRNA	Trps1 + unsp. siRNA
1	12907	11439	14134	12269	12876	13976
2	11954	10812	13459	11461	12045	13184
3	11846	10681	13132	11249	11780	13289
∅	12235,6667	10977,3333	13575	11659,66667	12233,6667	13483
STABW	583,894111	405,14483	510,972602	538,2391042	571,83943	430,166247
ttest		0,03741127	0,04034615	0,011074438	0,99682105	0,8231633
Prozent ∅	1	0,89715858	1,10946141	0,95292451	0,99983654	1,10194241
Prozent STABW	0,04772066	0,03311179	0,04176091	0,043989357	0,04673545	0,03515675

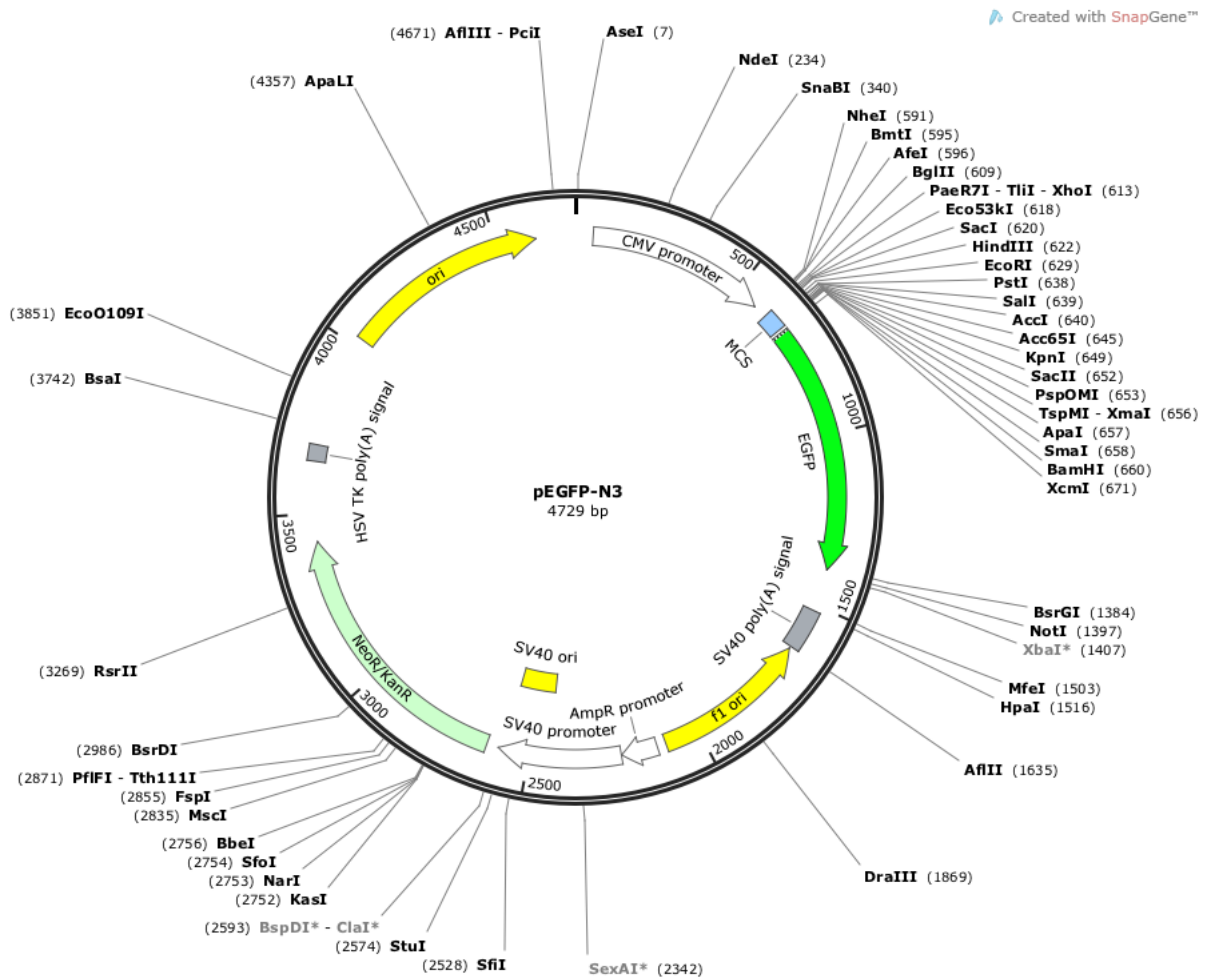
Tabelle 9-5: Hdac Aktivität nach Trps1 und Hdac2, 4 und 6 siRNA Transfektion

	u.t.	Trps1	Hdac2 siRNA	Hdac4 siRNA	Hdac6 siRNA
1	16455	17738	14985	15195	15853
2	15909	17543	15244	15374	16105
3	16254	17488	15287	14967	16243
∅	16206	17589,66667	15172	15178,66667	16067
STABW	276,1467	131,370976	163,367683	203,9910129	197,7574272
ttest		0,001431593	0,00505123	0,006593218	0,517559772
Prozent ∅	1	1,0853799	0,93619647	0,936607841	0,99142293
Prozent STABW	0,01703978	0,008106317	0,01008069	0,012587376	0,012202729
	Trps1 + Hdac2 siRNA	Trps1 + Hdac4 siRNA	Trps1 + Hdac6 siRNA	unsp. siRNA	Trps1 + unsp. siRNA
1	16841	15576	17171	16574	17256
2	17002	15382	17294	16251	17185
3	16723	15631	16986	16016	17681
∅	16855,3333	15529,66667	17150,3333	16280,33333	17374
STABW	140,051181	130,8064728	155,036555	280,1541242	268,2293794
ttest	0,00269448	4,29526E-05	0,02004045	0,759857792	0,279214162
Prozent ∅	1,04006746	0,958266486	1,0582706	1,004586779	1,072072072
Prozent STABW	0,00864193	0,008071484	0,00956661	0,017287062	0,016551239

Tabelle 9-6: Auswertung der ATDC5 Differenzierung in Abhängigkeit von Hdac und HAT Inhibitoren

1. Versuchsreihe	7 Tage	14 Tage	21 Tage	28 Tage
unbehandelt	3	5	8	11
ITS	8	15	27	36
ITS + 50 μ M NaB	9	17	29	42
ITS + 10 nM TSA	8	28	41	65
ITS + 25 μ M NaB + 5nM TSA	6	21	34	51
ITS + 5 μ M HAT Inh. II	1	3	6	9
2. Versuchsreihe				
unbehandelt	3	4	4	6
ITS	5	14	25	35
ITS + 50 μ M NaB	4	13	26	40
ITS + 10 nM TSA	9	26	47	57
ITS + 25 μ M NaB + 5nM TSA	7	17	33	44
ITS + 5 μ M HAT Inh. II	2	3	5	6
3. Versuchsreihe				
unbehandelt	2	5	9	16
ITS	2	9	19	28
ITS + 50 μ M NaB	3	16	23	34
ITS + 10 nM TSA	7	21	36	53
ITS + 25 μ M NaB + 5nM TSA	5	18	27	42
ITS + 5 μ M HAT Inh. II	1	4	7	13
4. Versuchsreihe				
unbehandelt	4	7	12	17
ITS	7	18	27	34
ITS + 50 μ M NaB	9	20	32	44
ITS + 10 nM TSA	11	32	49	68
ITS + 25 μ M NaB + 5nM TSA	9	24	39	52
ITS + 5 μ M HAT Inh. II	2	5	10	14
Ø. Versuchsreihen				
unbehandelt	3	5,25	8,25	12,5
ITS	5,5	14	24,5	33,25
ITS + 50 μ M NaB	6,25	16,5	27,5	40
ITS + 10 nM TSA	8,75	26,75	43,25	60,75
ITS + 25 μ M NaB + 5nM TSA	6,75	20	33,25	47,25
ITS + 5 μ M HAT Inh. II	1,5	3,75	7	10,5
STABW				
unbehandelt	0,81649658	1,25830574	3,30403793	5,06622805
ITS	2,64575131	3,74165739	3,7859389	3,59397644
ITS + 50 μ M NaB	3,20156212	2,88675135	3,87298335	4,3204938
ITS + 10 nM TSA	1,70782513	4,57347424	5,90903263	6,94622199
ITS + 25 μ M NaB + 5nM TSA	1,70782513	3,16227766	4,9244289	4,99165971
ITS + 5 μ M HAT Inh. II	0,57735027	0,95742711	2,1602469	3,6968455
ttest gegen ITS				
ITS + 50 μ M NaB	0,31893179	0,2287778	0,04620509	0,00889871
ITS + 10 nM TSA	0,06093074	0,00011614	0,00247348	0,00180155
ITS + 25 μ M NaB + 5nM TSA	0,341576	0,0162766	0,0042395	0,00494255
ITS + 5 μ M HAT Inh. II	0,05336272	0,01068693	0,00323904	0,00585154

9.2. Plasmidkarte pEGFP-N3



Danksagung

Ganz besonders möchte ich Frau Prof. Dr. Andrea Vortkamp für die Überlassung dieses Dissertationsthemas, die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, für anregende Diskussionen, Hilfestellungen und Tipps, während meiner Laborarbeit und für hilfreiche Tipps zur Anfertigung dieses Manuskriptes danken.

Frau Dr. Manuela Wuelling möchte ich vor allem für ihre motivierten und motivierenden Analysen meiner Experimente, für kenntnisreiche Diskussionen, Hilfestellungen und die thematische und methodische Betreuung meiner Arbeit danken. Ganz besonderer Dank gilt ihr dafür, dass sie jedes geschriebene und gesprochene Wort, bezüglich Poster und Präsentationen, während meiner Promotion, kontrolliert und verbessert hat. Auch möchte ich ihr sehr für die gründlichen und ausgezeichneten Korrekturen dieser Dissertationsschrift danken.

Für das überaus freundschaftliche und angenehme Miteinander in der Arbeitsgruppe, für Hilfen bei meinen Versuchen und für konstruktive Diskussionen möchte ich mich bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken.

Großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Michael Ehrmann und Herrn Prof. Dr. Bernhard Horsthemke, die sich bereit erklärt haben, im Sinne meines Promotionskomitees, meine Versuche und Ergebnisse zu diskutieren und mir mit ihrem Wissen interessante Hilfestellungen zukommen lassen haben.

Dr. Frank Kaiser danke ich für das Überlassen der Trps1 und Hdac4 Expressionsplasmide herzlich.

Der DFG möchte ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Graduiertenkollegs 1431 "Transkriptionskontrolle, Chromatinstruktur und DNA Reparatur in Entwicklung und Differenzierung" danken.

Meinem Vater gilt mein Dank für alle Unterstützungen und Hilfen in den vergangenen Jahren.

Publikationen

Wuelling, M., **Pasdziernik, M.**, Moll, C.N., Thiesen, A.M., Schneider, S., Johannes, C. and Vortkamp, A. (2012). Trps1 regulates mitotic progression in chondrocytes by activating histone deacetylases. Manuskript in Begutachtung.

Pasdziernik, M., Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C., Klinger, C., and Kaufmann, M. (2009). On the cytotoxicity of HCR-NTPase in the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. BMC research notes 2, 102

Poster

Pasdziernik et al., 2007. Effect of histone deacetylase inhibition on chondrocyte differentiation. 6. Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg/Essen, Deutschland.

Pasdziernik et al., 2008. Characterization of the multi-zinc finger transcription factor Trps1. 2. Retreat des Graduiertenkollegs 1431 "Transkriptionskontrolle, Chromatinstruktur und DNA Reparatur in Entwicklung und Differenzierung", Dormagen-Zons, Deutschland.

Pasdziernik et al., 2010. Function of the multi-zinc finger transcription factor Trps1 during chondrocyte differentiation. "Chromatin and Epigenetics" Konferenz. Transcription, chromatin structure and DNA repair in development and differentiation. Essen, Deutschland.

Vorträge

Pasdziernik, M., 2007. The role of histone deacetylases in endochondral bone formation. 1. Retreat des Graduiertenkollegs 1431 "Transkriptionskontrolle, Chromatinstruktur und DNA Reparatur in Entwicklung und Differenzierung", Wetter-Volmarstein, Deutschland.

Pasdziernik, M., 2009. Characterization of the multi-zinc finger transcription factor Trps1 during chondrocyte differentiation. 3. Retreat des Graduiertenkollegs 1431 "Transkriptionskontrolle, Chromatinstruktur und DNA Reparatur in Entwicklung und Differenzierung", Dormagen-Zons, Deutschland.

Pasdziernik, M., 2010. Function of the multi-zinc finger transcription factor Trps1 during chondrocyte differentiation. 4. Retreat des Graduiertenkollegs 1431 "Transkriptionskontrolle, Chromatinstruktur und DNA Reparatur in Entwicklung und Differenzierung", Düsseldorf-Kaiserswerth, Deutschland.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärungen**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie, und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Charakterisierung des Multi-Zinkfinger Transkriptionsfaktors Trps1 während der Chondrozyten Differenzierung“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Markus Pasdziernik befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____
(Prof. Dr. Andrea Vortkamp)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie, und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____
(Markus Pasdziernik)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie, und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____
(Markus Pasdziernik)